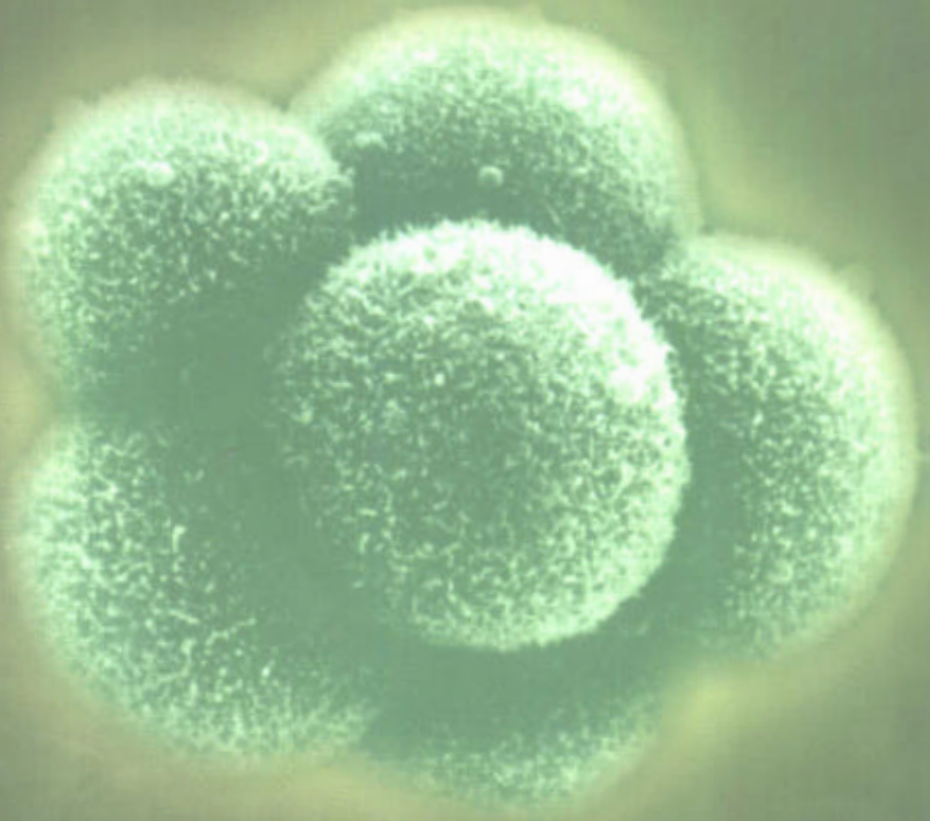
面向21世纪课程教材
Textbook Series for 21st Century

发育生物学

张红卫　主编
王子仁　张士璀　副主编



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

面向21世纪课程教材
Textbook Series for 21st Century

发育生物学

张红卫 主编

高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

内容简介

本书是教育部“高等教育面向21世纪教学内容和课程体系改革计划”的研究成果，是“面向21世纪课程教材”

本书系编者参考国内外发育生物学及相关教材，结合多年教学实践编写而成。全书共分6篇23章，全面、系统地介绍了动物个体发育模式，细胞命运特化和胚轴形成，器官形成，细胞分化的分子机制，发育生物学新热点以及植物发育等基本理论和基本知识，同时介绍了发育生物学的最新研究进展。

本书可作为高等学校生物科学专业本科生的发育生物学课程教材，也可供发育生物学、细胞生物学、遗传学、医学、水产学等学科相关专业研究生及研究人员参考和自学用。

图书在版编目(CIP)数据

发育生物学/张红卫主编．—北京：高等教育出版社，2001

面向21世纪课程教材

ISBN 7-04-008956-4

Ⅰ．发… Ⅱ．张… Ⅲ．发育生物学-高等学校-教材 Ⅳ．Q111

中国版本图书馆CIP数据核字(2001)第031236号

责任编辑 王 莉 **封面设计** 张 楠 **责任绘图** 朱 静
版式设计 马静如 **责任校对** 许月萍 **责任印制** 陈伟光

发育生物学
张红卫 主编

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市东城区沙滩后街55号 **邮政编码** 100009
电 话 010-64054588 **传 真** 010-64014048
网 址 http://www.hep.edu.cn
http://www.hep.com.cn

经 销 新华书店北京发行所
印 刷 北京民族印刷厂

开 本 850×1168 1/16 **版 次** 2001年8月第1版
印 张 33 **印 次** 2001年8月第1次印刷
字 数 830 000 **定 价** 34.60元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题，请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

《发育生物学》编写人员

主　编　张红卫
副主编　王子仁　张士璀

编　者
山东大学　张红卫　左嘉客　陈永喆
兰州大学　王子仁
青岛海洋大学　张士璀

前　言

发育生物学是一门新兴的生命科学，主要研究多细胞生物发育的机制。近十年来发育生物学的研究取得了突飞猛进的发展，发育生物学已成为当代最活跃的生命科学研究领域之一。为适应发育生物学的发展和高等学校发育生物学教学的需要，我们编写了这本教材。

本书将发育生物学的基础理论和基础知识分为6个方面来进行讨论，这6个方面包括动物个体发育模式，细胞命运特化和胚轴形成，器官形成，细胞分化的分子机制，发育生物学新热点以及植物发育。全书共23章，其中绪论、第一章、第八章、第十五～十九章由山东大学张红卫编写，第二章、第三章由上海计划生育研究所左嘉客编写，第四～七章、第二十章和第二十一章由青岛海洋大学张士璀编写，第九～十四章由兰州大学王子仁编写，第二十二章、第二十三章由山东大学陈永喆编写。另外，孔维华、毛炳宇、张燕君、陈穗云、梁恺龙、颜贵军等同志也为该书的编写付出了劳动。特别是中国科学院细胞生物学研究所丁小燕教授在肩负繁重科研任务的同时，对本书的初稿进行了认真审阅，提出了许多宝贵的意见。高等教育出版社的孙素青、王莉同志为本书的出版付出了辛勤的劳动。在此一并表示衷心感谢。

为了内容的衔接和便于学习者使用，编者力求深入浅出，既讲述了胚胎发育形态学的知识，又介绍了发育分子机制研究的最新进展。但由于发育生物学研究进展太快，编写困难较大，编写时间也较仓促，受学术水平所限，书中欠妥之处和错误在所难免，诚恳希望同行和读者提出批评和建议，以便修改再版。

主编

2001年1月

目　录

绪论 …… 1
第一节　发育生物学的研究对象、任务及其与其他学科的关系 …… 1
第二节　动物发育的主要特征和基本规律 …… 2
第三节　发育生物学的发展简史 …… 5

第一篇　动物个体发育模式

第一章　生殖细胞发生 …… 11
第一节　生殖细胞的起源与分化 …… 11
第二节　精子发生 …… 17
第三节　卵子发生 …… 21
参考文献 …… 30
第二章　受精的机制 …… 32
第一节　卵母细胞成熟 …… 32
第二节　精子获能 …… 33
第三节　精卵识别的分子基础 …… 35
第四节　配子遗传物质的融合 …… 41
第五节　卵的激活 …… 42
参考文献 …… 43
第三章　卵裂 …… 45
第一节　胚胎的卵裂方式 …… 45
第二节　卵裂的机制 …… 57
参考文献 …… 61
第四章　原肠作用：胚胎细胞的重新组合 …… 62
第一节　海胆 …… 63
第二节　文昌鱼 …… 67
第三节　鱼类 …… 69
第四节　两栖类 …… 71
第五节　鸟类 …… 78
第六节　哺乳类 …… 84
参考文献 …… 88
第五章　脊椎动物的早期发育 …… 90
第一节　神经胚形成概述 …… 91
第二节　中胚层 …… 100
第三节　内胚层 …… 118
参考文献 …… 120

第二篇　细胞命运特化和胚轴形成

第六章　细胞的自主特化：形态发生决定子 …… 123
第一节　细胞定型和分化 …… 123
第二节　形态发生决定子 …… 125
第三节　胞质定域 …… 128
第四节　形态发生决定子的性质 …… 139
参考文献 …… 142
第七章　细胞命运的渐进特化：胚胎细胞相互作用 …… 144
第一节　验证“种质学说” …… 144
第二节　两栖类发育调控 …… 152
第三节　Nieuwkoop 中心 …… 157
第四节　神经诱导 …… 159
第五节　反应能力和诱导级联反应 …… 162
参考文献 …… 162
第八章　胚轴形成 …… 164
第一节　果蝇胚轴形成 …… 164
第二节　两栖类胚轴形成 …… 178
参考文献 …… 185

第三篇 器官形成

第九章 胚胎诱导与组织、器官形成 …… 189
第一节 初级胚胎诱导 …… 189
第二节 反应组织 …… 191
第三节 异源诱导者 …… 193
第四节 次级诱导和三级诱导 …… 196
第五节 邻近组织的相互作用 …… 196
第六节 单细胞水平的诱导作用 …… 207
参考文献 …… 211
第十章 神经系统的发育 …… 212
第一节 神经系统的组织发生 …… 212
第二节 神经连接的形成 …… 232
参考文献 …… 248
第十一章 附肢的发育和再生 …… 250
第一节 脊椎动物附肢的发育 …… 250
第二节 有尾两栖类附肢的再生 …… 269
参考文献 …… 281
第十二章 眼的发育 …… 283
第一节 眼的早期形态发生概述 …… 283
第二节 视泡发育的机制 …… 285
第三节 晶状体发育的机制 …… 292
第四节 晶状体的再生和转分化 …… 300
第五节 角膜的发育 …… 302
参考文献 …… 305
第十三章 变态——激素调节发育和细胞分化 …… 307
第一节 昆虫的变态 …… 307
第二节 两栖类的变态 …… 318
第三节 在乳腺发育中多种激素的相互作用 …… 328
参考文献 …… 332
第十四章 性腺发育和性别决定 …… 334
第一节 哺乳动物性腺的发育 …… 334
第二节 哺乳动物的性别决定 …… 336
第三节 果蝇的性别决定 …… 344
第四节 雌雄同体 …… 350
第五节 环境的性别决定 …… 353
参考文献 …… 355

第四篇 细胞分化的分子机制

第十五章 基因组相同和基因差异表达 …… 361
第一节 同一有机体不同组织细胞基因组相同的证据 …… 361
第二节 核潜能的限定 …… 363
第三节 基因组相同的例外——基因组的改变 …… 366
参考文献 …… 370
第十六章 染色质水平基因活性的调控 …… 372
第一节 异染色质 …… 372
第二节 选择性基因转录的染色质变化 …… 376
参考文献 …… 377
第十七章 转录水平的调控 …… 379
第一节 基因表达的时间和空间特异性 …… 379
第二节 发育中基因转录水平的调节和变化 …… 380
第三节 差异基因转录的调控机制 …… 384
参考文献 …… 397
第十八章 RNA 加工水平的调控 …… 399
第一节 mRNA 前体与 mRNA …… 399
第二节 RNA 加工水平的调控 …… 403
参考文献 …… 409
第十九章 翻译和翻译后的调控 …… 410
第一节 翻译水平的调控 …… 410
第二节 早期发育中母体效应因子的影响 …… 413
第三节 翻译和翻译后调控的机制 …… 416
参考文献 …… 423

第五篇 发育生物学新热点

第二十章 动物发育的环境调控 …… 427
第一节 环境对正常发育的调控 …… 427
第二节 环境对正常发育的扰乱破坏作用 …… 439
第三节 遗传和环境之间的相互作用 …… 444
参考文献 …… 445
第二十一章 发育和进化 …… 446

第一节　达尔文的发育和进化观 …… 446
第二节　胚胎起源 …… 447
第三节　新门类的形成 …… 448
第四节　模块化:通过发育产生进化的先决条件 …… 450
第五节　发育制约因素 …… 455
第六节　DNA水平的变化和发育进化 …… 459
第七节　新型细胞的形成 …… 463
第八节　进化发育生物学 …… 464
参考文献 …… 465

第六篇　植物发育

第二十二章　植物的营养生长 …… 469
第一节　植物发育生物学概论 …… 469
第二节　植物的早期发育 …… 471
第三节　植物的分生组织及营养生长 …… 476
参考文献 …… 479

第二十三章　植物的生殖生长 …… 480
第一节　成花诱导 …… 480
第二节　花器官的发育 …… 483
第三节　植物的双受精 …… 485
参考文献 …… 490

索引 …… 492

绪　论

第一节　发育生物学的研究对象、任务及其与其他学科的关系

发育生物学(developmental biology)是应用现代生物学的技术研究生物发育本质的科学。它主要研究多细胞生物体从生殖细胞的发生、受精、胚胎发育、生长、衰老和死亡,即生物个体发育(ontogeny)中生命过程发展的机制。同时,也研究生物种群系统发生(systematics development)的机制。发育生物学并不是传统的胚胎学(embryology),而是20世纪50年代以后,由于分子生物学、细胞生物学、遗传学及生物化学等其他生命学科的发展和与胚胎学的相互渗透,才逐渐发展和形成的一门新兴的生命科学。

生物体在整个生命周期都处于动态的发育中。发育(development)指生命现象的发展,生物有机体的自我构建和自我组织。多细胞有机体的生命过程是一个相对缓慢和逐渐变化的过程,我们称这个过程为个体发育。一般情况下,多细胞有机体的个体发育开始于一个单细胞——受精卵(fertilized egg),或者称为合子(zygote)。由受精卵通过一系列的分裂和变化形成胚胎(embryo)和产生有机体的所有细胞。传统的胚胎学是研究动物从受精到出生之间有机体的发育,即胚胎发育。但有机体的发育在出生以后并未停止,甚至大多数成年生物体也依然继续发育,如成年人皮肤的表皮细胞仍在不断地更新,成体哺乳动物骨髓中仍然有大量的造血干细胞发生。而发育生物学研究的范围不仅涉及胚胎发育,还包括幼体、成体的发育,包括整个生命过程中其他所有生命现象的发展,同时也还包括异常的发育过程,如肿瘤、畸形等。

细胞是构成多细胞有机体的基本单位,个体发育的基础是细胞分化(cell differentiation)。一个单细胞受精卵,如何通过一系列的细胞分裂和细胞分化,产生有机体的所有形态和功能不同的细胞,这些细胞又如何通过细胞之间的相互作用共同构建各种组织和器官,建成一个有机体并完成各种发育过程,这些都是发育生物学研究的主要任务。从另一个角度来讲,任何生命现象都是遗传信息按一定的时间、空间和次序表达的结果,即按照发育的遗传程序(genetic program)展开的结果。发育具有严格的次序性,发育并不是个别基因的表达,而是众多基因表达在时间和空间上的联系和配合。因此发育生物学的主要任务是研究生物体发育的遗传程序及其调控机制。在个体发育中,基因表达的程序、时间、位置和数量是受不同层次的调控机制所控制。阐明发育机制的核心问题是弄清遗传信息以何种方式编码在基因组上,DNA上的一维信息又是如何控制生物体的三维形态结构的构建和生命现象的发展。众所周知,揭示发育和遗传的本质是生命科学中紧密联系的两大难题。经过50年的研究,特别是分子生物学与遗传学研究的结合使遗传学的一系列重大问题取得了突破以后,我们所面临的下一个最大挑战就是对发育本质的揭示。90年代以来,由于在果蝇和线虫发育分子机制研究方面取得的突破性进展,尤其是"反向发生遗传学"方法的应用,人们能够直接

研究高等动物发育中基因的功能。对高等动物发育在基因水平的分析已全面展开，发育生物学的研究进入了一个高速发展的新时期：认识动物和人类发育的分子机制和阐明发育本质的时期。人们把探索生命进化奥秘的希望寄托于发育生物学的研究。许多学者和诺贝尔奖得主纷纷涌向这个领域，发育生物学已成为生命科学研究的前沿和主战场之一。

发育生物学能够成为当代最活跃的生命科学研究领域之一，有两个方面的主要原因：一方面是因为近十年来人们开始能够认识动物发育的分子机制，对动物发育过程基因水平的分析已经全面展开，对植物发育分子机制的研究也已开始；另一方面是由于发育生物学的研究制造了一个网络，将分子生物学、细胞生物学、遗传学、生物化学、生理学、解剖学、免疫学、胚胎学和进化生物学甚至生态学等多种生命科学都整合在一起。发育生物学的形成和发展本身是多学科相互渗透的结果，它代表了现代生命科学的结晶。

目前，由于细胞生物学、遗传学、生物化学及分子生物学的迅速发展，人们对真核细胞基因组的结构及基因表达的调控，基因产物构建细胞结构和调节细胞功能的机制等已有一定的了解，对于许多生物大分子的结构和功能已有所认识，这些成果又使细胞的结构和功能活动在分子水平上得到了更圆满的解释。同时，应用各种分子遗传学和基因工程技术对高等生物发育和遗传的分析取得了惊人的进展，特别是在动物克隆、人类基因组研究计划实施等一系列重大研究成果的带动下，基因、细胞和发育已成为生命科学研究的一条主线。对于发育的研究已成为解决任何其他生命科学问题所必需。通过发育生物学的研究，能够将多种生命科学整合起来，发育生物学的发展也将促进其他生命科学的发展。

发育生物学既是重要的基础生命科学，其研究成果又具有广阔的应用前景，对于解决人口、健康、农业生产的发展和生物资源的利用都有着重要意义。发育生物学的研究不仅涉及正常发育的机制，还涉及异常发育的机制，对于肿瘤、艾滋病、畸形发生机制的研究是临床医学的基础。由于人类基因组研究计划的顺利进行，将能够更清楚地阐明人类正常发育和异常发育的分子机制，这也是攻克癌症和其他绝症的必要理论基础。关于受精和早期胚胎发育机制的研究是计划生育、优生、优育工作的理论根据。克隆技术、胚胎切割、转基因动植物等生物技术的应用，对国民经济和农业现代化的可持续发展具有重要意义。

学习和掌握发育生物学的知识，必须将所学过的其他相关生命科学如分子生物学、细胞生物学、遗传学、生物化学、生理学、解剖学、免疫学、胚胎学和进化生物学等的知识融会贯通，整合起来形成完整的知识体系。同时，必须关注发育生物学研究的动态，了解其新进展，以弥补教科书的不足。学习发育生物学的知识也必须注意理论联系实际，解决科学研究和生产实践问题。

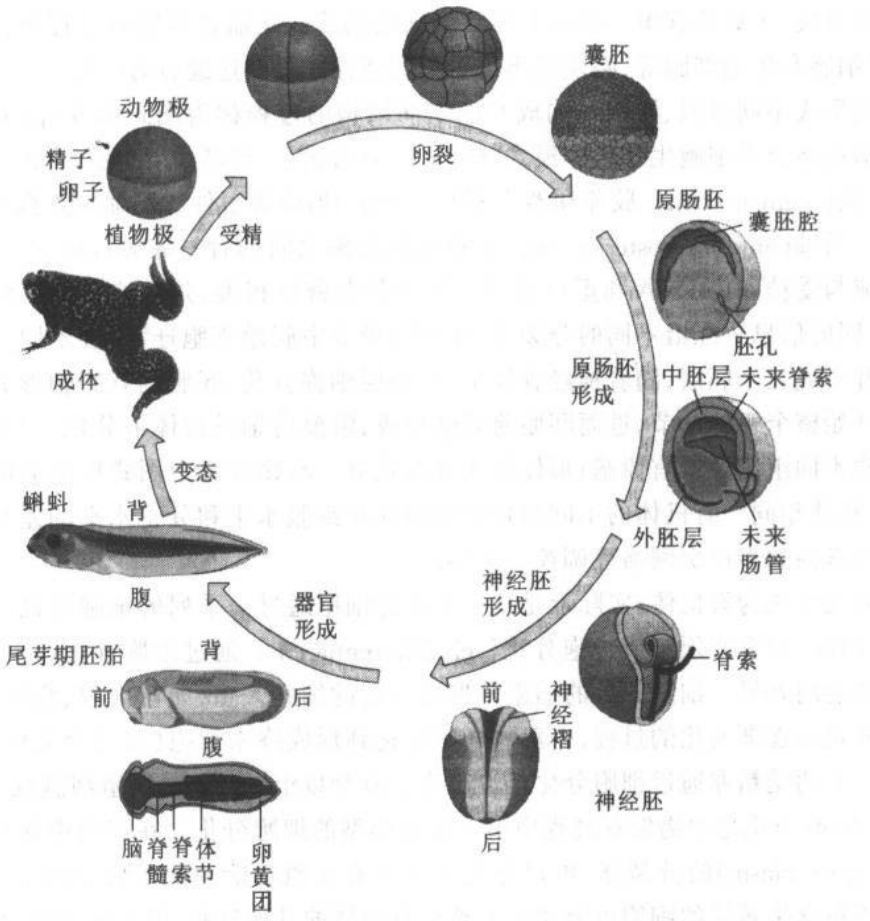
第二节 动物发育的主要特征和基本规律

发育的特征是具有严格的时间和空间的次序性，这种次序性由发育的遗传程序控制。发育是有机体的各种细胞协同作用的结果，也是一系列基因网络性调控的结果。在发育的过程中涉及多种生命现象，如细胞分裂，细胞分化，细胞迁移，细胞凋亡，生长、衰老和死亡等。

多细胞有机体的发育有两个主要的功能：产生细胞的多样性并使各种细胞在本世代有机体中有严格的时间和空间的次序性；保证世代的交替和生命的连续。前一个功能涉及有机体全部细胞

的产生和组织成为结构。从一个单细胞受精卵通过细胞分裂和分化产生肌肉细胞、皮肤细胞、神经细胞及血细胞等所有的细胞表型，这些细胞差异性产生的过程称为分化(differentiation)。不同表型的细胞构成组织、器官，建立结构的过程叫做形态发生(morphogenesis)。生长(growth)则指生物个体大小的增加。有机体通过生长发育成为成熟个体，再经过衰老(aging)，最后死亡。发育的第二个主要功能是通过繁殖(reproduction)产生新一代的个体，使世代连续。

新个体的生命开始于两性配子(gamete)——精子(sperm)和卵子(ovum)的融合，其融合过程称为受精(fertilization)。通过受精激活发育的程序，受精卵开始胚胎发育(embryogenesis)。从一个单细胞受精卵发育成为多细胞有机体必须经过非常复杂的过程。在整个动物王国中，由于各种动物的形态不同，其卵子也有不同的类型，胚胎发育的模式是多种多样的，不同器官、系统形态发生的图式也各不相同。但大多数动物都要经过受精、卵裂(cleavage)、原肠胚形成(gastrulation)、神经胚形成(neurulation)和器官形成(organogenesis)等几个主要的胚胎发育阶段才能发育形成幼体，通过生长发育为成体。在动物界中有些动物的个体发育还必须经历变态(metamorphosis)，如两栖类必须经历尾部退化、四肢生长和呼吸系统改变等才能发育成为成体(绪图－1)。



绪图－1　爪蟾(*Xenopus laevis*)个体发育的主要阶段和生活史

个体发育从卵子和精子结合、受精开始，经卵裂、原肠胚形成、神经胚形成、器官形成和变态，发育成为成体。由成体产生两性配子，经受精开始另一世代的发育

受精后，受精卵立即开始一系列迅速的有丝分裂，分裂成许多小细胞即分裂球(blastomeres)，这个过程称为卵裂。卵裂不同于其他的细胞分裂，在每次卵裂前后，胚胎的体积并不发生变化，细胞周期只包括 DNA 复制和细胞分裂期而没有细胞生长期，因此，通过卵裂产生大量的小分裂球。一般情况下，这些细胞各具有一套完全相同的胚胎基因组拷贝，但是只在细胞群体中生存。到卵裂后期，由这些分裂球聚集构成圆球形囊泡状的胚胎，称为囊胚(blastula)。到囊胚后期，有丝分裂的频率明显降低，以后胚胎进入原肠胚期。在这个时期，胚胎产生一系列广泛的、戏剧性的细胞运动，细胞之间的位置信息发生改变。这一系列使细胞位置发生重排的广泛的细胞运动过程称为原肠胚形成。通过原肠胚形成，胚胎细胞分化成为三个胚层：位于胚胎外层的细胞称为外胚层(ectoderm)，位于胚胎内层的细胞称为内胚层(endoderm)，位于内胚层和外胚层之间的细胞称为中胚层(mesoderm)。这三个胚层的细胞逐渐获得不同的发育潜能，分化产生不同类型的细胞并建立各种组织和结构。外胚层细胞主要分化形成表皮和神经系统，内胚层细胞主要分化形成消化道上皮和消化腺(如肝、胰等)，由中胚层细胞产生心脏、肾、性腺、结缔组织及血细胞等。胚胎在三个胚层建立之后即开始进入神经胚形成阶段，形成脑和脊髓的原基——神经管(neural tube)。神经管是在一系列细胞相互作用下由胚胎背中部的细胞形成的，这也是脊椎动物器官形成的前奏。随后，各种器官原基相继形成，多数器官由一种以上的胚层细胞构成。在器官形成的过程中，有些细胞，例如血细胞、色素细胞和生殖细胞等，必须经历长距离的迁移才能到达最后的位置。

胚胎细胞形成不同组织、器官和构成有序空间结构的过程称为图式形成(pattern formation)。最初的图式形成涉及多细胞生物形体模式(body plan)的建立，后者主要包括胚轴(embryonic axes)形成、体节形成(segmentation)、肢芽和器官原基(anlage)形成等事件。胚轴主要指从胚胎前端到后端之间的前－后轴(anterior-posterior axis)和背侧到腹侧之间的背－腹轴(dorsal-ventral axis)。动物胚轴的形成与受精卵内 RNA 和蛋白质的不均匀分布密切相关，并且涉及一系列早期发育的事件：卵裂将不同的信息分配给不同的分裂球；在原肠形成中胚胎细胞迁移，含不同信息的细胞间发生相互作用并形成三个胚层；随着神经管发生，中胚层细胞分化，胚胎的背腹轴形成；神经管分化，从原脑分节开始整个躯体分节，进而胚胎前后轴形成；沿前后轴进行体节分化，三个胚层细胞进一步分化并构建不同组织和器官原基；形体模式逐渐建立。动物发育中图式形成的调控机制比较复杂，不同的有机体和同一有机体的不同发育阶段都存在细胞水平和分子水平的差异。上述发育过程是在一系列基因的多层次网络性调控下进行的。

从受精卵发育成为有机体，实际上是从一个全能细胞通过一系列的细胞分化产生有机体全部细胞表型的过程。发育必须经历细胞分化(cell differentiation)，通过细胞分化产生细胞形态结构、生化组分和功能的差异。细胞分化的结果是形成一定的细胞表型，如血细胞、肌肉细胞、皮肤细胞等等。细胞分化是逐渐变化的过程，一般从开始分化到形成终末细胞(或完全分化)之间要经过多次有丝分裂。人的受精卵通过细胞分化至少产生 250 种以上的细胞。生殖细胞(germ cell)与体细胞(somatic cell)的分化是动物发育过程中第一次最典型的细胞分化。在卵裂中拥有特殊卵质成分——生殖质(germ plasm)的分裂球，可以分化产生具有生殖功能的配子(gamete)的前体——生殖细胞。其他不包含生殖质的细胞可分化产生整个有机体的其他细胞，但不能产生生殖细胞，我们称它们为体细胞。生殖细胞以后迁移到性腺中进一步分化成为配子，这个过程叫做配子发生(gametogenesis)。成体动物的配子经过释放和受精再形成新个体使种族延续，而成熟有机体最终走向衰老死亡。发育中绝大多数细胞的核基因组是保持恒定的，即使在已分化的许多细胞中也包含着完

整的基因组，但细胞分化的潜能逐渐被限定，逐渐地只能发育成为一定范围表型的细胞。由于生物有机体对不同类型的细胞需求不同，为了控制各种细胞的数目和各种器官按一定的比例发育，有机体必须对细胞分裂进行精确的控制和发生一部分细胞凋亡(cell apoptosis)。在成体动物中，发育和分化并未停止，伴随发育的进程，成体细胞衰老、死亡，最终引起个体发育的终止即死亡。

第三节　发育生物学的发展简史

发育生物学是由于细胞生物学、遗传学、生物化学及分子生物学等生命科学的发展和与胚胎学的相互渗透，在胚胎学的基础上发展和形成的一门新兴的生命科学。讨论发育生物学的发展史，有必要回顾胚胎学理论的发展。许多胚胎学的理论建立于数百年以前，有的甚至是几千年以前建立的。回顾这些理论建立的历史，有利于理解现在发育生物学所进行的研究内容。

一、后成论与先成论

早在公元前4世纪，Aristotle(公元前384—322年)对于动物胚胎的不同部分和成体动物各种结构形成的原因就提出了自己的观点。他认为只有两种可能：一种可能是卵子或精子中本来具有微小的结构，在发育过程中逐渐长大形成胚胎和成体的结构；另一种可能是卵子或精子中本来并不具有这些结构，而是在发育过程中逐渐形成的。在观察鸡、星鲛和一些无脊椎动物胚胎发育的基础上，他首先提出了胚胎是由简单到复杂逐渐发育形成的，这个理论后来称为后成论(theory of epigenesis)。在当时，这个理论的影响很大。但到了公元17世纪后期和18世纪，以精源学说和卵源学说为代表的先成论(theory of preformation)占统治地位。精源学说认为胚胎预先存在于精子中，卵源学说则认为卵子中本来就存在微小的胚胎雏形。这两种学说的共同点在于都认为胚胎是成体的雏形，是配子中固有的结构，胚胎发育仅仅是原有结构的增大。这两种学说还认为卵子中含有所有后代的微小胚胎，一个世代包含下一个世代，使种族得以延续。1759年德国科学家Wolff的*Theoria Generationis*和*Formatione Intestinorum*两本著作的发表，再一次提出了后成论的观点。Wolff根据自己对鸡胚发育的仔细观察，认为卵子中并不存在胚胎结构，胚胎与成体并不相同，胚胎发育是逐渐变化的过程。后成论的观点直到19世纪才为人们所接受。

二、细胞理论对胚胎发育和遗传概念的影响

关于生殖细胞的特性和重要意义是随着细胞生物学的发展才逐渐被人们认识到的。1839年德国著名植物学家Schleiden和生理学家Schwann指出，所有生物有机体都由细胞构成，细胞是生命的基本单位；通过细胞的有丝分裂产生其他细胞。因此，发育也必然是逐渐变化的过程。在胚胎发育中，通过受精卵的分裂产生许多新细胞，同时产生新的细胞类型。到19世纪40年代，对于卵子的特性开始有所认识，认识到卵子也是一个细胞，一个特殊的细胞。Weismann进一步提出后代所具有的双亲遗传特性来自于生殖细胞——精子和卵子，来自于两性配子所携带的遗传特性。之后，对于海胆等的研究进一步显示，在受精初期受精卵中包含两个细胞核，其中一个来源于卵子，另一个来源于精子，在受精过程中两个细胞核融合。到19世纪后期，人们通过一系列研究认识到，合子细胞核的染色体中各有一半分别来源于两个亲代，而合子的遗传信息在卵裂过程中平均分配到

子细胞中去，这就为遗传特性的传递提供了物质基础。细胞核的重要性和染色体在遗传中重要作用的发现，证明了孟德尔遗传定律的正确性。人们通过对染色体数目的比较发现，体细胞的染色体数保持不变，但是在配子形成过程中，二倍体(diploid)的前体细胞经过减数分裂形成单倍体(haploid)的配子，单倍体配子通过受精形成二倍体的合子，由合子再产生胚胎。这些发现揭开了生物学发展史的新篇章。

三、发育的嵌合型和调整型

胚胎是由一个单细胞的合子通过一系列的分裂和分化产生的。自从人们认识到这一点之后就开始探索单细胞合子是如何通过分化产生有机体所有形态和功能不同的细胞。早在 19 世纪 80 年代，Weismann 就提出了关于细胞、染色体和基因与胚胎发育关系的理论。他认为，合子的细胞核含有大量特殊的信息物质——决定子(determinant)，在卵裂的过程中这些决定子被不均匀地分配到子细胞中去控制子细胞的发育命运。细胞的命运实际上是由卵裂时所获得的合子核信息早已预定的，这一类型的发育我们称为嵌合型发育(mosaic development)。在嵌合型发育的卵子中的遗传信息是分散存在的。Weismann 理论的核心强调早期卵裂必须是不对称分裂。由于合子成分的不均匀分布，其卵裂结果产生的子细胞彼此之间是完全不同的。胚胎学家 Roux(1887)的实验结果也支持 Weismann 的理论。Roux 用烧热的解剖针破坏两细胞时期蛙胚的一个分裂球，结果存活的另一个分裂球只能发育成为半个胚胎。由此他认为蛙的发育存在嵌合型发育机制，细胞的特征和命运是在卵裂的过程中决定的。但 Driesch (1891)用海胆为实验材料重复 Roux 的实验却得到了完全不同的结果。他在海胆两细胞时期将两个分裂球分开，得到了两个发育正常的、个体较小的海胆幼体。Driesch 的实验结果第一次证明发育过程中存在调整型发育(regulative development)机制：胚胎为保证正常的发育，可以产生胚胎细胞位置的移动和重排。

四、诱导的发现

尽管 Driesch(1876—1941)提出的调整型发育机制已经涉及细胞之间的相互作用，但是一直到诱导(induction)现象发现之后，人们才真正认识到细胞之间的相互作用是胚胎发育最重要的核心问题。诱导是指一类组织与另一类组织的相互作用，前者称为诱导者(inductor)，后者称为反应组织，诱导者可指令邻近反应组织的发育。1924 年 Spemann(1868—1941)和助手 Mangold 进行了著名的胚孔背唇移植实验。这个实验将蝾螈(*Triton cristatus*)原肠胚早期的胚孔背唇组织移植到另一同期受体胚胎的胚孔侧唇表面，随着受体胚胎发育的进程，大部分移植组织也内陷进入胚胎内，结果到原肠胚后期诱导产生了另一个次生胚。由于胚孔背唇组织具有调控和组织一个几乎完整的胚胎产生的特殊能力，故称为组织者(organizer)。从此，发育中诱导和细胞之间相互作用的重要性才得到充分的重视。由于这项重大的发现，Spemann 在 1935 年获得医学和生理学诺贝尔奖。

五、遗传学与胚胎学的结合

1900 年是一个转折点。Correns，De Vriess 和 Tschermak 分别报道了育种实验的结果，重新肯定了 Mendel 早在 1865 年提出的遗传规律。Boveri(1902)对海胆的研究发现，正常的胚胎发育决定于正常的染色体组型，染色体在正常发育中具有重要作用。之后的研究进一步提出基因型(genotype)与表型(phenotype)的概念。基因型是有机体从双亲获得的遗传信息所赋有的特性。有机体

在不同发育时期表现出来的形态、结构、生化等特征称为表型。由基因型控制发育，同时有机体的表型又受到环境因子与基因型的共同影响，例如，孪生兄弟尽管具有相同的基因型，但是随着年龄的增长，由于生活中所接触的环境因子的差异，他们的表型也存在一定的差异。所以发育实际上可以看作是基因型与表型的结合。既然发育受遗传信息的控制，那么在发育过程中合子从双亲获得的遗传信息是如何表达的，一个单细胞的合子又是如何发育成为具有功能的有机体的，要回答这些难题，需要将遗传学和胚胎学的研究结合起来。随着基因编码蛋白质的发现，不少问题迎刃而解，使科学家们认识到细胞的性质是由细胞中所包含的蛋白质决定的，而这些蛋白质由基因编码，由此基因在发育中的基本作用被揭示。基因通过其编码产物——蛋白质的变化控制发育分化中细胞的性质和习性。也就是说，遗传和发育是个体发生过程的两个方面，两者的关系十分密切。对于发育性状的研究，既可以从遗传现象的出现进行研究，又可以从发育过程进行研究。发育受遗传程序的控制，遗传特性通过发育展现出来，没有遗传就没有发育，没有发育也就无所谓遗传。当今发育生物学与遗传学在分子水平上是融会贯通的。

六、分子生物学与发育生物学的结合

关于发育的研究虽然已有很长的历史，但发育生物学是一个新兴的学科，是20世纪50年代后才开始逐渐形成的。自从Watson和Crick(1953)根据X衍射和化学分析提出的DNA分子的双螺旋模型之后，DNA作为遗传物质的基础对于人们已不再是个抽象的概念。特别是60年代Nirenberg对DNA遗传密码的破译，Jacob和Monod (1960)提出并证明蛋白质合成调控机制的操纵子学说等研究成果，使分子生物学迅速发展。分子生物学与遗传学的结合，使遗传学的一系列难题得到了解答。人们逐渐认识到遗传信息主要是编码在细胞核内基因组DNA的一级序列，发育受遗传信息的控制。为回答发育的遗传程序是以何种方式编码在基因组DNA上，编码在DNA上的遗传信息又如何控制生物体的发育等问题，人们开始采用分子生物学方法和各种新兴的生物学技术进行发育机制的研究。在许多学者的共同努力下，目前对于果蝇和线虫发育的分子控制机制已基本得到阐明。在深入了解果蝇和线虫发育机制的基础上，近年来又利用发育调控基因在进化上的保守性，开展对脊椎动物发育分子机制的深入研究，对于斑马鱼、爪蟾等模型动物的研究也已取得一系列重大的突破。由于它的迅速发展，发育生物学已成为当代生命科学研究的前沿和热点领域之一。

第一篇

动物个体发育模式

多细胞有机体的个体发育开始于精子和卵子的融合，通过受精激活发育的程序，开始复杂的胚胎发育过程。尽管各种动物形态不同，卵子类型不同，胚胎发育的模式也多种多样，但是它们的发育一般都要经过几个主要的胚胎发育阶段，即受精、卵裂、原肠胚形成、神经胚形成和器官形成才能发育成为幼体，通过生长发育为成体，再经历衰老、死亡完成个体发育。

第一章　生殖细胞发生

进行有性繁殖的高等生物，由生殖细胞(germ cell)分化，产生世代交替的桥梁——配子(gamete)，使种族的生命得以延续而构成生活周期(life cycle)。在这个生活周期中，雌性配子和雄性配子结合形成合子(zygote)。合子通过一系列复杂的发育过程，产生具有体细胞(somatic cell)和生殖细胞的多细胞有机体。每个世代的个体经历个体发育过程，同时由成熟个体的生殖细胞分化形成雌性配子和雄性配子，再由两性配子结合开始另一个世代的个体发育。如此周而复始。已知在很早期的发育阶段，昆虫、脊椎动物和其他许多动物的生殖细胞和体细胞就有明显的分化，也有不少动物体细胞与生殖细胞的分化并不确定，在一定的条件下体细胞能够转化成为生殖细胞，如腔肠动物、扁虫和被囊动物等。另外，许多无脊椎动物的孢子(zooid)、息肉 (polyp)和芽(bud)的体细胞也具备产生新个体的能力。

第一节　生殖细胞的起源与分化

在胚胎发育初期生殖细胞就已经决定的动物，其生殖细胞来源于它的前体——原生殖细胞(primordial germ cell，简称 PGC，复数为 PGCs)。这些原生殖细胞只有经过迁移，进入发育中的生殖腺原基(genital anlage)——生殖嵴(genital ridge)才能分化成为生殖细胞。原生殖细胞的起源可追溯到相当早期的胚胎发育阶段。在有些动物的卵母细胞中已可识别生殖质(germ plasm)的存在。生殖质是具有一定形态结构的特殊细胞质，主要由蛋白质和 RNA 构成。由于富含 RNA，可以被嗜碱性染料着色。随着胚胎发育的进行，生殖质逐渐地被分配到一定的细胞中，这些具有生殖质的细胞将分化成为原生殖细胞。不同动物在生殖腺原基发生时，原生殖细胞以不同的迁移方式进入生殖腺原基，在那里进行生殖细胞的分化。有些种类的动物生殖细胞的发生开始于卵裂早期，而多数脊椎动物生殖细胞的发生开始于胚胎发育较晚的时期。生殖质的形态、结构和特性，原生殖细胞的形成以及原生殖细胞迁移的原因和路线在各类动物中不一致。

一、生殖质与生殖细胞分化

线虫未受精卵有一种均匀分布于整个卵质中的 P 颗粒。受精后 P 颗粒集中位于预定胚胎的后部。第一次卵裂形成一个 AB 大细胞和一个含有 P 颗粒的 P1 小细胞(图 1.1A)。由 P1 细胞经过三次有丝分裂，每次分裂产生一个体细胞前体和一个 P 生殖干细胞。在第四次卵裂中产生的 P4 细胞是所有生殖细胞的始祖细胞，生殖细胞最初的分化开始于 P4 细胞(图 1.1B)。P4 细胞质内含有所有原来卵质中的 P 颗粒，表明 P 颗粒可能对于生殖细胞的分化具有重要作用。*Pie*－1 基因的功能涉及 P 细胞维持生殖干细胞的属性，该基因编码的核蛋白 PIE－1 仅存在于生殖干细胞中，随着发育的进程 *Pie*－1 基因停止表达。

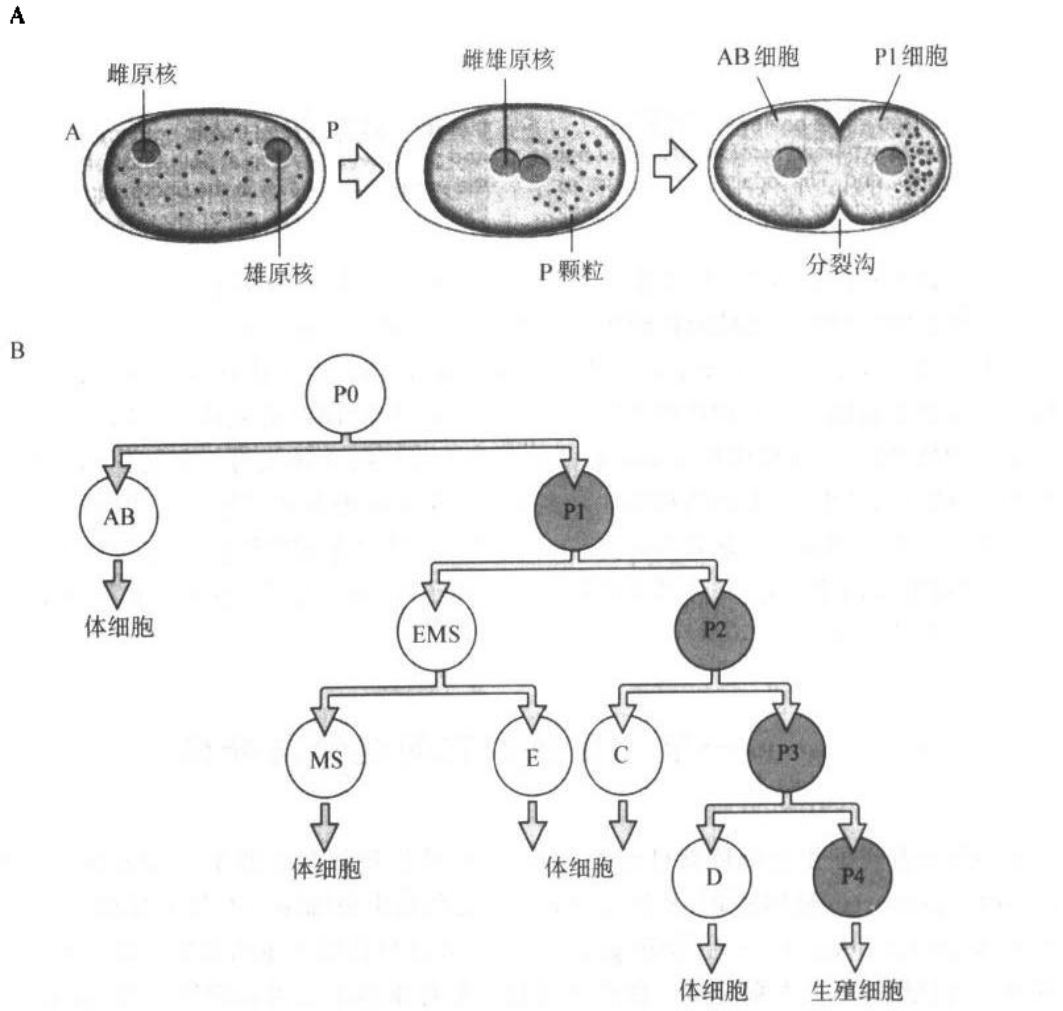


图 1.1　线虫 P 颗粒对最初细胞分化的影响

A. 线虫的 P 颗粒均匀分布于整个未受精卵的卵质中，受精后集中位于预定胚胎的后部。第一次卵裂形成一个 AB 细胞和一个含有 P 颗粒的 P1 细胞　B. 线虫卵裂时 P 颗粒和 PIE-1 蛋白全部分配到 P 细胞中，由 P4 细胞产生全部生殖细胞

果蝇生殖质与生殖细胞命运决定之间的关系已基本阐明。果蝇原生殖细胞最早发现于受精后大约 90 min，这些原生殖细胞位于果蝇胚胎后端，含有特殊的极质颗粒。如果用紫外线照射受精卵，破坏集中分布于受精卵后端胞质中的生殖质的活性，在以后的发育中将没有生殖细胞发生。如果将一个 *P* 基因型受精卵后端胞质中的生殖质移植到另一个 *Y* 基因型早期卵裂阶段胚胎的前端胞质内，可使 *Y* 基因型胚胎的前端细胞也分化成为原生殖细胞。如果将这些原生殖细胞再移植到另一胚胎的后端，并让其进一步迁移进入生殖腺原基，这些细胞可以发育成为功能性生殖细胞(图 1.2)。

有些母体效应基因(maternal-effect gene)的表达对于果蝇生殖质的形成具有重要作用。在目前已发现的 8 个母体效应基因中，只要其中任何一个基因产生突变，都能引起由其异源合子产生的个体无后代，而其同源合子由于缺乏生殖质，只能发育成为没有生殖细胞的不育个体。这 8 个基因

中，*oskar* 基因对于生殖质的形成和装配起着极其重要的调控作用，*oskar* mRNA 定位于卵子的后极。在 *oskar* mRNA 的 3′末端非翻译区内含有其定位信号，在微管的作用下可以准确的定位。*oskar* mRNA 3′末端的定位信号可以用 *bicoid* mRNA 3′末端的定位信号取代。如果把用此方法制备的重组 DNA 用于构建转基因果蝇，结果转基因果蝇所产的卵前后极都含有 *oskar* mRNA。

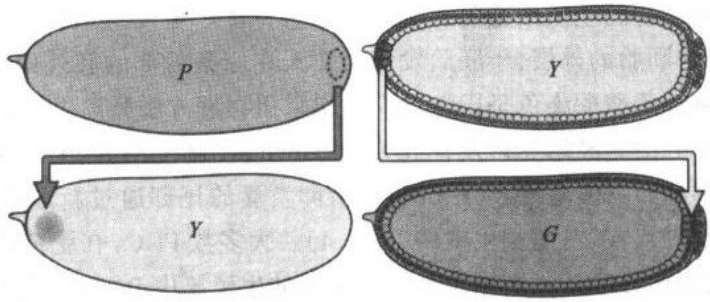


图 1.2　移植果蝇的极质能够引起生殖细胞分化

左图示将供体 *P* 基因型受精卵后端生殖质注射到 *Y* 基因型卵裂早期胚胎的前端，可使 *Y* 基因型胚胎前端细胞分化成为原生殖细胞。右图示将这些原生殖细胞再移植到另一胚胎的后端，它们可以发育成为功能性生殖细胞

已证明生殖质在爪蟾受精卵中的存在。爪蟾生殖质是位于植物极附近富含 RNA 和蛋白质的一团特殊细胞质。在卵裂过程中，由于卵质的不均匀分布，生殖质仅存在于靠近植物极的少数分裂球之中。只有含生殖质的少数分裂球能够发育成为原生殖细胞。如果用紫外线照射爪蟾受精卵的植物极，可导致胚胎缺乏生殖细胞的发生；如果将其他爪蟾受精卵中的生殖质注射进经紫外线照射过的爪蟾受精卵中，可以弥补紫外线照射的影响，使胚胎具有生殖细胞。

目前，还没有证据表明小鼠和其他哺乳动物生殖细胞发生与生殖质的关系。小鼠生殖细胞发生涉及细胞之间的相互作用。如果把培养的胚胎干细胞注射进小鼠内细胞团里，既可以产生体细胞，也可以产生生殖细胞。在小鼠胚胎中最早能够识别的原生殖细胞位于原条后端。

二、原生殖细胞的迁移

1. 两栖类原生殖细胞的迁移

在无尾两栖类受精后最初的两次分裂过程中，由于微管的作用，位于植物半球的生殖质集中，形成较大的一团特殊胞质覆盖于植物极质膜下面。随着进一步的卵裂，这些生殖质沿着分裂沟迁移，囊胚期生殖质位于囊胚腔底部细胞的分裂沟附近（图 1.3），到原肠胚期原生殖细胞（PGCs）位于原肠腔底部内胚层中。然后，PGCs 通过肠壁内胚层的侧面迁移并进入背侧肠系膜。背侧肠系膜是连接肠壁与中胚层器官形成区域的纽带。PGCs 沿背侧肠系膜往上迁移到达生殖嵴，之后 PGCs 与生殖嵴细胞共同形成生殖腺。生殖嵴细胞内的

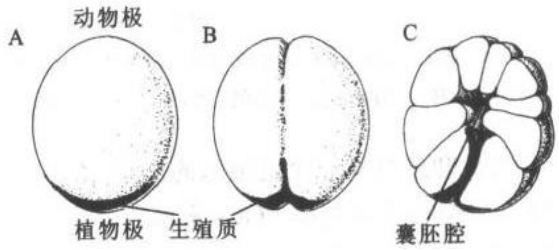


图 1.3　蛙早期胚胎中生殖质位置变化示意图

A. 最初生殖质在受精卵中位于植物极附近　B. 卵裂开始后生殖质沿分裂沟移动　C. 囊胚期生殖质位于囊胚腔底部细胞的分裂沟附近

一些因子是 PGCs 定向迁移的重要因素。有些两栖类动物的 PGCs 也能够主动迁移，如非洲爪蟾的 PGCs 能伸出一个伪足进行运动。PGCs 的迁移途径由含黏着蛋白的细胞外基质构成。

有尾两栖类的生殖细胞发生与无尾两栖类的有一些差别。在蝾螈的卵内似乎没有特殊定位的生殖质，PGCs 的形成受内胚层区域的诱导，并且可能通过不同的途径迁移到生殖嵴。

2．哺乳动物生殖细胞的迁移

在发育早期，哺乳动物的生殖细胞没有特殊的形态特征。免疫组织化学方法显示，小鼠 PGCs 最初来源于原肠作用中胚胎的外层，于胚胎发育第 7 天在原条后部的胚外中胚层中有 8 个 PGCs，这些细胞体积较大，碱性磷酸酶染色呈阳性反应。如果用物理方法分离去除该区域，胚胎将缺乏生殖细胞；而分离的这部分细胞经培养可发育成大量的 PGCs。哺乳动物 PGCs 先在尿囊与后肠交接处附近聚集，以后迁移到卵黄囊附近再分成两群，沿卵黄囊的尾部通过新形成的后肠，然后沿背侧肠系膜向上迁移，分别进入左、右两侧生殖嵴(图 1.4)。大多数 PGCs 在受精后第 11 天到达发育中的生殖腺。在迁移过程中，PGCs 不断增殖，在第 12 天的生殖腺中 PGCs 的数目已由最初的 8～100 个增加至 2 500～5 000 个。哺乳动物 PGCs 的迁移与其接触的上皮细胞相关，PGCs 通过伸出伪足在上皮细胞表面进行变形运动。PGCs 还能穿过单层细胞，在两层细胞之间迁移。至于 PGCs 具有确定迁移路线的机制还不清楚。Godin 等(1990)在体外培养体系中发现第 10.5 天小鼠胚胎的生殖嵴分泌弥散性分子，后者具备吸引和促进 8.5 天小鼠 PGCs 迁移和进行有丝分裂的能力。但是生殖嵴在体内是否具有同样的作用还有待证实。

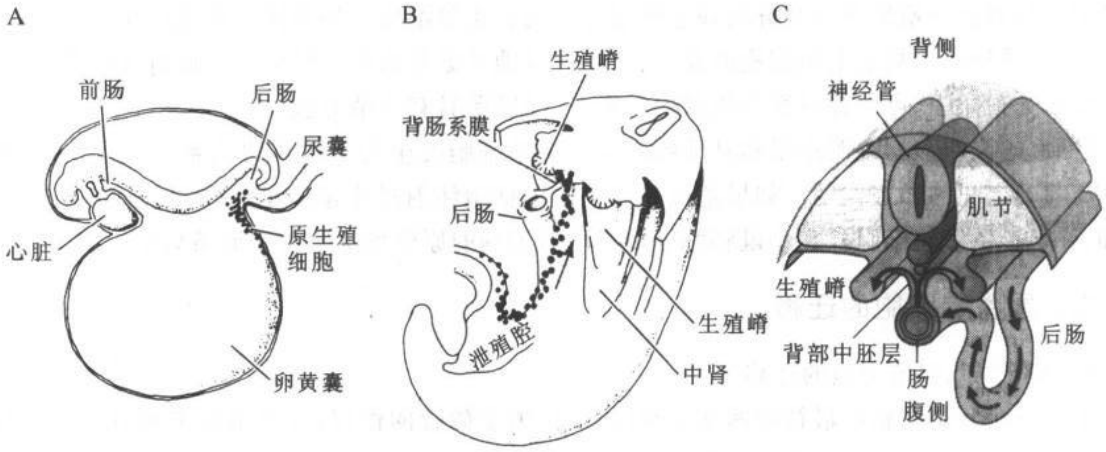


图 1.4 哺乳动物生殖细胞迁移的途径

A．PGCs 先在尿囊与后肠交接处附近聚集 B．PGCs 沿卵黄囊的尾部通过新形成的后肠，然后沿背侧肠系膜向上迁移，分别进入左、右两侧生殖嵴 C．小鼠胚胎原生殖细胞迁移的路线

3．鸟类和爬行类原生殖细胞的迁移

鸟类和爬行类动物的 PGCs 来源于外胚层细胞，然后经过明区的中部迁移到明区前缘与暗区交界处。这个区域称为生殖新月(germinal crescent)(图 1.5)，PGCs 在生殖新月区内增殖。与两栖类和哺乳类不同，鸟类和爬行类动物的 PGCs 主要借助血液循环进行迁移，当它们到达发育中的生殖腺时再离开血循环系统(图 1.6)。发育中的生殖腺对 PGCs 有吸引作用但是其机制还不清楚，可能生殖腺能产生一些化学物质吸引 PGCs，并能使它们停留于生殖腺的毛细血管壁上；同时生殖腺

毛细血管内皮细胞表面可能具备一些特殊的成分使 PGCs 吸附于其表面。单克隆抗体识别方法显示，不同的毛细血管内皮细胞具备不同的表面分子，卵巢毛细血管内皮细胞的表面分子与其他毛细血管内皮细胞的表面分子不同。有实验证明，鸡生殖腺不仅能吸引血液循环中的鸡 PGCs，甚至也能吸引小鼠 PGCs，这种吸引作用没有种间特异性。

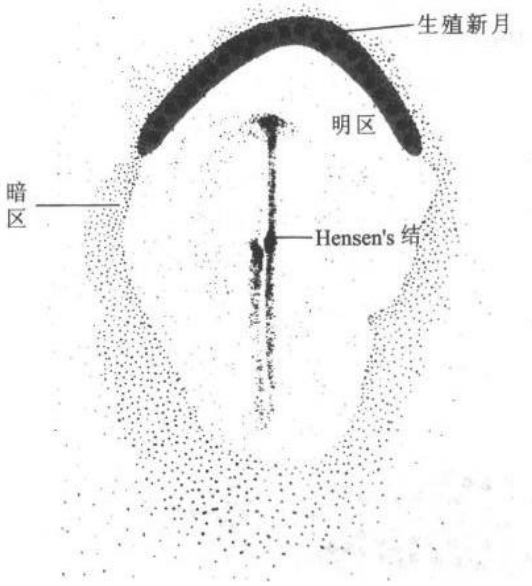


图 1.5　鸡胚原索期背侧示意图

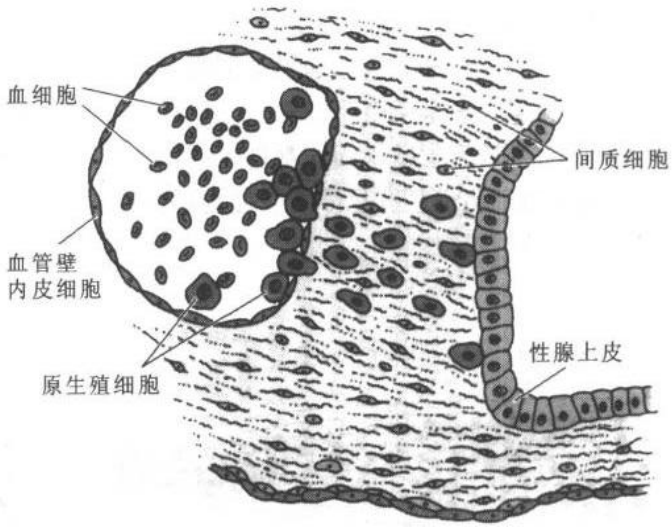


图 1.6　鸡胚 PGCs 穿过血管壁示意图
鸡胚 PGCs 可进、出血管，借助血液循环进行迁移

三、减数分裂

原生殖细胞进入生殖腺原基后不断地进行有丝分裂，产生生殖干细胞后代。由生殖干细胞分化成为雌性配子或雄性配子，必须经过减数分裂(meiosis)，使染色体数目由双倍体变成单倍体。生殖细胞于最后一次有丝分裂之后，核 DNA 继续合成并复制一次，因此在减数分裂开始前的细胞中，核内 DNA 的含量是正常体细胞的 2 倍，每条染色体内都有两条由中心粒相连的姐妹染色单体。在第一次减数分裂中，同源染色体配对，然后分离并分配到两个子细胞中，每个子细胞含有由两条姐妹染色单体组成的一条同源染色体。第二次减数分裂则把每条染色体中的两条姐妹染色单体分别分配到两个子细胞中去。结果由减数分裂形成的四个细胞都只含每条染色体的一个单拷贝。

值得注意的是，在减数分裂过程中，通过联会配对、同源染色体间遗传信息的交换和重组，每个单倍体细胞都含有不同的染色体组合。如人类具备 23 对染色体，一个人的基因组就可能形成 2^{23} (大约 10^3 万)个不同类型的单倍体细胞。此外，在粗线期和双线期因染色体交叉而导致的遗传物质交换，更增加了遗传性质的复杂化。所以由一个个体可产生大量不同的生殖细胞。

四、生殖细胞定向分化的决定

对于大多数动物，迁移进生殖腺原基的原生殖细胞具备两种发育潜能，由生殖腺内的微环境决

定分化成为精子或卵子。早在20世纪30年代，Humphreg等将雄性蝾螈的成熟睾丸移植入雌性体内，再把蝾螈的卵巢组织转移到睾丸，发现生殖细胞停止进行卵子发生并且开始向精子方向分化。家蝇和小鼠的生殖腺也能定向指导生殖细胞的发生。雌雄同体动物对研究这种转决定作用的机制提供了最佳的实验材料。例如秀丽新小杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)，它从精子发生转变为卵子发生只是很自然的生理事件。

这里涉及两种决定，第一种决定是生殖干细胞是进入减数分裂进行配子发生还是继续进行有丝分裂成为生殖干细胞；第二种决定是进行减数分裂的细胞是发育成卵子还是精子。秀丽新小杆线虫在生殖腺末端有一个不分裂的细胞，它对于决定生殖干细胞是进行有丝分裂还是减数分裂具有重要的作用，这个细胞被称为远端细胞(distal tip cell)(图1.7)。靠近这个细胞的生殖干细胞进行有丝分裂，形成一个生殖干细胞库。远离该细胞的生殖干细胞进入减数分裂。如果用激光束破坏远端细胞，则所有生殖干细胞都进入减数分裂；如果把远端细胞移植到生殖腺的其他位置，那么其附近的生殖细胞进行有丝分裂。可能远端细胞分泌的一些物质能够维持细胞进行有丝分裂，且抑制减数分裂的进行。

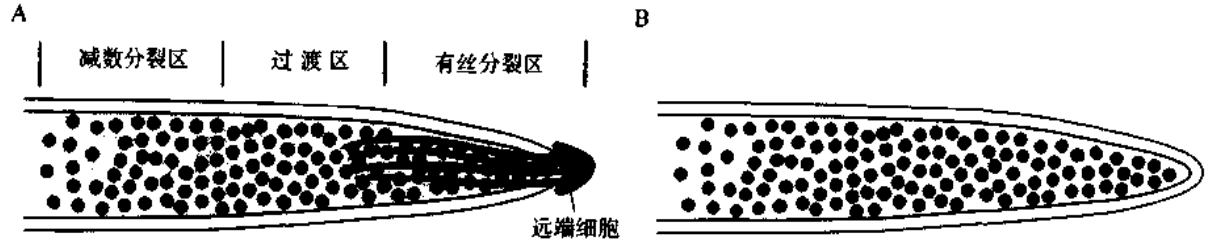


图1.7 秀丽新小杆线虫位于生殖腺末端的远端细胞，
对生殖干细胞进行有丝分裂或减数分裂具有调控作用
A. 在正常生殖腺中，靠近远端细胞的生殖干细胞进行有丝分裂，而远离该细胞的生殖细胞干进行减数分裂 B. 在缺失远端细胞或 *glp-1* 基因突变时全部细胞进入减数分裂

虽然目前还不清楚远端细胞和生殖细胞间的相互作用，但是已筛选到一个可以模拟去除远端细胞的突变体。在 *glp-1* 基因隐性突变的纯合子体内，所有生殖细胞都进入减数分裂，只产生5～8个精子细胞；而正常雌雄同体发育的四期幼虫中存在1 500个生殖细胞。产生野生型生殖细胞的嵌合体幼虫，其生殖细胞前体能对远端细胞作出反应并进行有丝分裂，但产生突变生殖细胞的嵌合体幼虫的生殖细胞进入减数分裂，这说明 *glp-1* 基因可能在生殖细胞对远端细胞的信号作出反应的过程中起作用。

在雌雄同体的动物中，开始减数分裂的细胞必须对即将进行分化的方向作出决定。通常在每个卵精巢(ovotestis)中，最近端的细胞产生精子，而最远端的细胞产生卵子。一些性别决定基因既能导致功能性雌性个体的形成，也能导致雄性个体的形成。在某些基因突变时能够改变原来的表型。如 *tra-1* 的纯合子只能发育成为产生精子的雄性个体，而 *fem-1* 的纯合子只能发育成为产生卵子的雌性个体。*tra-1* 和 *fem-1* 基因双重突变的纯合子是一种非常特殊的表型，它们的躯体表型为雄性，却产生雌性生殖细胞。*tra-1* 是组织中主要的性决定基因，而 *fem-1* 基因则负责精子和卵子定向分化的决定。在雌雄同体(XX)的动物中，如果生殖细胞是 *fem* 纯合子，则没有精子发生。*fem* 家族的 *fem-1*、*fem-2*、*fem-3* 基因协同作用可激活 *fog-1* 基因，*fog-1* 的

野生型等位基因能激活一些精子分化所必须的基因，同时抑制促卵子发生的 *mog－3* 基因的活性。*mog－3* 基因的缺失会导致生殖细胞雄性化，抑制卵子发生。当 *tra－1* 基因有活性时，*fog－1* 的活性被抑制，使卵子特异性 *mog－3* 基因表达。在这种情况下，生殖细胞的性别通常决定于个体的性别。野生型的秀丽新小杆线虫的生殖细胞既能形成卵子也能形成精子（见第十四章）。

第二节 精子发生

一、精子发生（spermatogenesis）

脊椎动物的 PGCs 一旦到达雄性胚胎的生殖腺原基就立即进入性索，然后停留在那里直到成熟。在成熟过程中，性索发育成为生精小管，其管上皮细胞分化成支持细胞（sertoli cell）。精子发生的过程在支持细胞的深凹处进行（图 1.8），支持细胞起滋养和保护作用。目前，对多种动物的精子发生已作了详细的研究，这里主要讨论哺乳动物精子发生的过程。

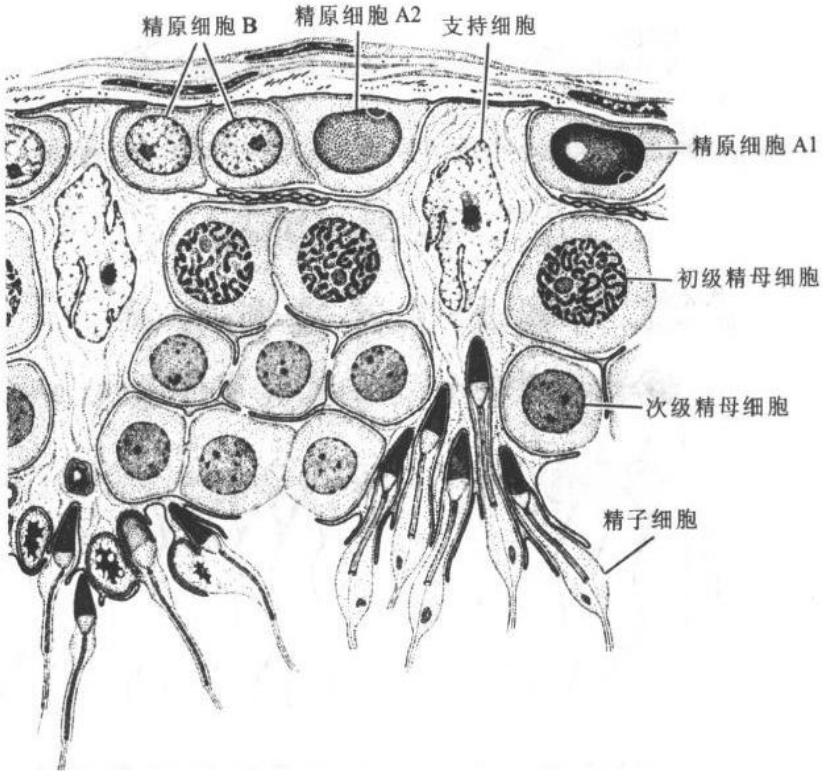


图 1.8 哺乳动物生精小管横切面模式图

示支持细胞与发育中的精子细胞的相互关系。精子发生的过程在支持细胞的深凹处进行，随着精子发生的进程从支持细胞的深凹处向生精小管管腔迁移

当哺乳动物 PGCs 到达发育中的生殖腺之后，PGCs 分裂形成精原细胞 A1（type A1 spermato-

gonium)。精原细胞 A1 位于紧邻性索外的基膜附近，比 PGCs 小，具有卵圆形的细胞核，核内包含与核膜相连的染色质。以后精原细胞 A1 分裂，形成另一个精原细胞 A1 和一个着色较浅的精原细胞 A2。因此，精原细胞 A1 是能够分裂复制自身并产生另一类细胞的生殖干细胞。精原细胞 A2 分裂形成精原细胞 A3，后者经分裂形成精原细胞 A4。由精原细胞 A4 分裂形成过渡型精原细胞(intermediate spermatogonium)。这些过渡型精原细胞分裂形成精原细胞 B。精原细胞 B 通过有丝分裂产生初级精母细胞(primany spermatocyte)，初级精母细胞将进入减数分裂。从精原细胞的分裂开始，在以后的生殖细胞分裂过程中，细胞质的分裂是不完全的。多个细胞形成合胞体，细胞之间通过直径 1μm 的细胞质桥沟通。持续的分裂产生相互间连接的细胞克隆，并且细胞间离子和分子能通过细胞质间桥而相互影响，因而每群细胞同步成熟。

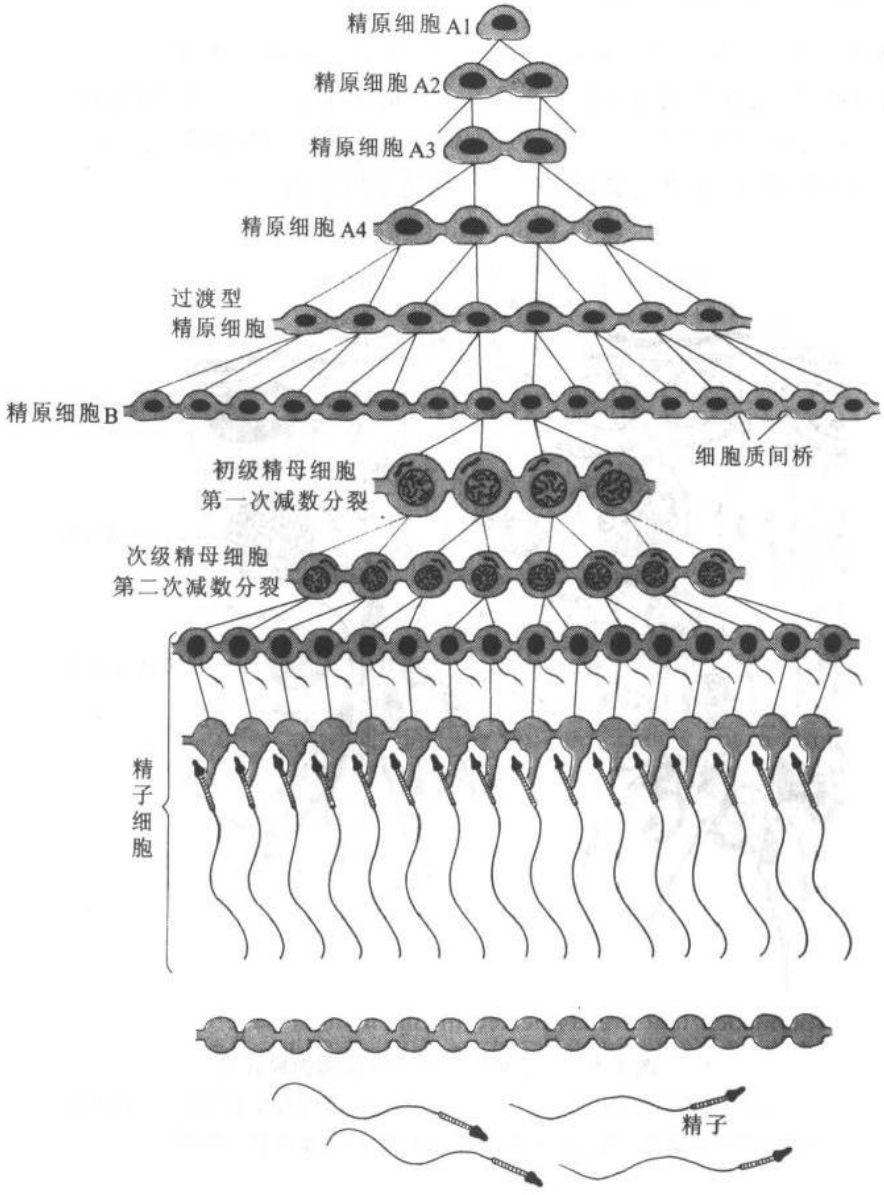


图 1.9 哺乳动物精子发生过程

初级精母细胞通过第一次成熟分裂形成次级精母细胞(secondary spermatocyte),再经过一次成熟分裂完成减数分裂。经减数分裂形成的单倍体细胞称为精子细胞(spermatid)。精子细胞间仍然通过细胞质间桥而相互连接(图 1.9)。这样连接的精子细胞虽然只有单倍体的核,但事实上具有双倍体类似的功能,因为在一个细胞中产生的基因产物容易弥散到邻近细胞的细胞质中。从精原细胞 A1 到精子细胞的分裂过程中,细胞不断远离生精小管的基膜,接近生精小管的管腔。因此,在管腔的不同层次能见到不同分化时期的细胞。精子细胞位于管腔的边缘,在那里失去它们之间的细胞质连接,进一步分化成精子。

二、精子形成

单倍体的精子细胞是圆形、无鞭毛的细胞,形态上与脊椎动物成熟精子有很大的区别。精子细胞还必须经过精子形成的分化过程才能成为成熟的精子。通过精子形成,使精子具备运动能力和与卵子相互作用的能力。哺乳类精子的分化过程的第一步是顶体(acrosome)的形成。顶体是由高尔基复合体构建成的囊状结构,似一个"帽子"覆盖于精子核顶部(图 1.10)。随着"帽子"的形成,精子核发生旋转,使顶体面向生精小管的基膜。这种旋转是必须的,因为在精子核的另一边由中心粒构成鞭毛的过程正在开始,而鞭毛将延伸入管腔内。在精子形成的最后阶段细胞核染色质凝集,大部分细胞质成分被抛弃,线粒体环绕鞭毛基部形成环状。形成的精子进入管腔。

小鼠从生殖干细胞到成熟精子的全部发育过程约需 34.5 天。精原细胞阶段持续 8 天,减数分裂持续 13 天,精子形成需要 13.5 天。人类精子的发育约需要 74 天才能完成。由于精原细胞 A1 是生殖干细胞,所以精子的发生能够持续进行。

图 1.10 人类精子结构示意图

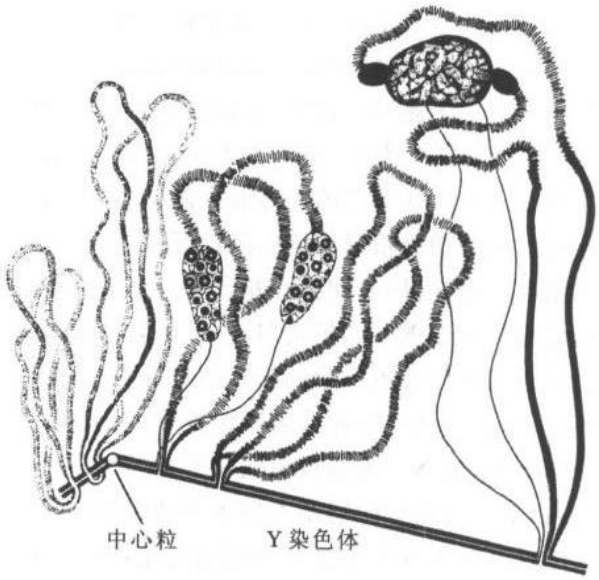


图 1.11 果蝇呈灯刷状 Y 染色体的结构

三、精子发生中基因表达的调控

精子发生过程中基因转录主要发生在减数分裂的双线期，虽然在多种动物中已观察到这种转录活动，但最好的例子是果蝇(*Drosophila hydei*)Y染色体的转录活动。用电子显微镜观察果蝇Y染色体，可见到灯刷状的结构(图1.11)。来源于Y染色体的转录是控制精子发生所必需的。虽然Y染色体的功能并不涉及性别的决定，但却为正常的精子形成所必需。尽管XY型和XO型两种果蝇都是雄性，但后者却无生育能力。果蝇的Y染色体上有5个向外伸出的DNA环，如果这5个环中有任何一个缺失，精子尾部的结构都不正常，即使在构成精子的所有元件都已具备的情况下也不能正确装配。显然，在减数分裂前期转录的Y染色体特异性RNA是以后精子形成过程所必需的。

在精子发生过程中被特异性转录的基因产物，通常是精子运动和精子与卵子结合时都必需的蛋白质。如β_2-微管蛋白是果蝇(*Drosophila melanogaster*)的一种精子特异性基因表达的产物。β_2-微管蛋白仅在精子发生过程中表达。其功能是参与形成减数分裂的纺锤体、鞭毛的轴纤丝和与线粒体拉长相关的微管。β_3-微管蛋白是另一种β-微管蛋白的同等型(isoform)分子，在正常情况下于中胚层细胞和表皮细胞中表达。β_3-微管蛋白不能替代β_2-微管蛋白行使功能。尽管把β_2-微管蛋白基因的5′末端调控区与β_3-微管蛋白基因的编码区结合，可以使β_3-微管蛋白基因在精子发生中表达，但是如果β_2-微管蛋白基因缺失，采用β_3-微管蛋白替代时，初级精母细胞不能进行减数分裂，轴纤丝不能装配，细胞核也不发生变形，仅观察到线粒体拉长的现象。这表明精子特异性基因产物β_2-微管蛋白对于减数分裂中纺锤体和轴纤丝的形成是非常重要的。β_2-微管蛋白的作用并不是其他β-微管蛋白同等型分子能够代替的。

精子与卵子的胞外基质结合相关分子也是在精子发生过程中转录的基因产物。海胆的结合蛋白(bindin)基因在精子发生相对迟的阶段转录，一旦转录，其mRNA就迅速翻译成蛋白质。这些结合蛋白在顶体囊泡中积累，在成熟的海胆精子中形成单独的顶体小泡。

与卵母细胞类似，精子发生中也存在贮存性mRNA，供以后发育阶段使用。如哺乳动物和鸟类具有一种特殊形式的乳酸脱氢酶(LDH-X)，这种酶的mRNA在精子发生过程中转录，在减数分裂前期的初级精母细胞中就已经存在。由于LDH-X的存在，发育中的精子能够利用丙酮酸作为能源。同样，许多动物在精子发生的最后阶段，有一种特殊的小分子——鱼精蛋白(protamine)在细胞核中出现。鱼精蛋白含32个氨基酸残基，其中只有4~5个氨基酸残基不是精氨酸。鱼精蛋白能够取代染色质中的组蛋白。在精子发生过程中，由于组蛋白被鱼精蛋白或某些被修饰的组蛋白所取代，使单倍体的基因组处于凝集状态。在精子发生的后期，许多动物精子的组蛋白处于被修饰状况，如N-末端被磷酸化等，这种修饰进一步导致染色体的凝集，使转录活动激剧下降。因此，在随后的发育阶段基本检测不到雄性基因组的转录活动。利用鳟鱼鱼精蛋白mRNA的cDNA片段检测精子发生中鳟鱼鱼精蛋白基因的表达，发现初级精母细胞中存在鱼精蛋白mRNA，但是这些贮存于核糖核蛋白颗粒中的mRNA并不翻译。只有到了精子细胞阶段，即大约转录后一个月，才翻译成鱼精蛋白。鱼精蛋白mRNA的翻译受其3′末端非翻译区调控，如果把鱼精蛋白mRNA的3′末端非翻译区连接到其他mRNA上，后者也能出现同样的翻译调控。

在精子发生中，不仅减数分裂前期存在基因转录活动，而且某些基因在单倍体的精子细胞阶段转录。利用杂合子小鼠进行研究，发现其生殖腺内有两种精子。如果RNA和蛋白质的合成发生

于二倍体细胞阶段，那么所有的精子都应显示同样的表型。事实上，其中一些精子显示突变表型，另一些精子却显示野生型特征。

第三节　卵子发生

一、卵母细胞的减数分裂

虽然卵子发生(oogenesis)和精子发生同样都经过减数分裂，但是与精子发生的过程并不完全相同(图 1.12)。首先，通过精子发生形成的配子，实质上是一个“能运动的细胞核”，而由卵母细胞形成的配子却含有启动发育和维持代谢所需要的全部元件。因此卵子发生的过程除了形成单倍体的细胞核之外，还要建立一个由酶、mRNA、细胞器和代谢产物等所组成的细胞质库，具备十分复杂的细胞质体系。其次，卵母细胞有一个很长的减数分裂前期，使卵母细胞充分生长。

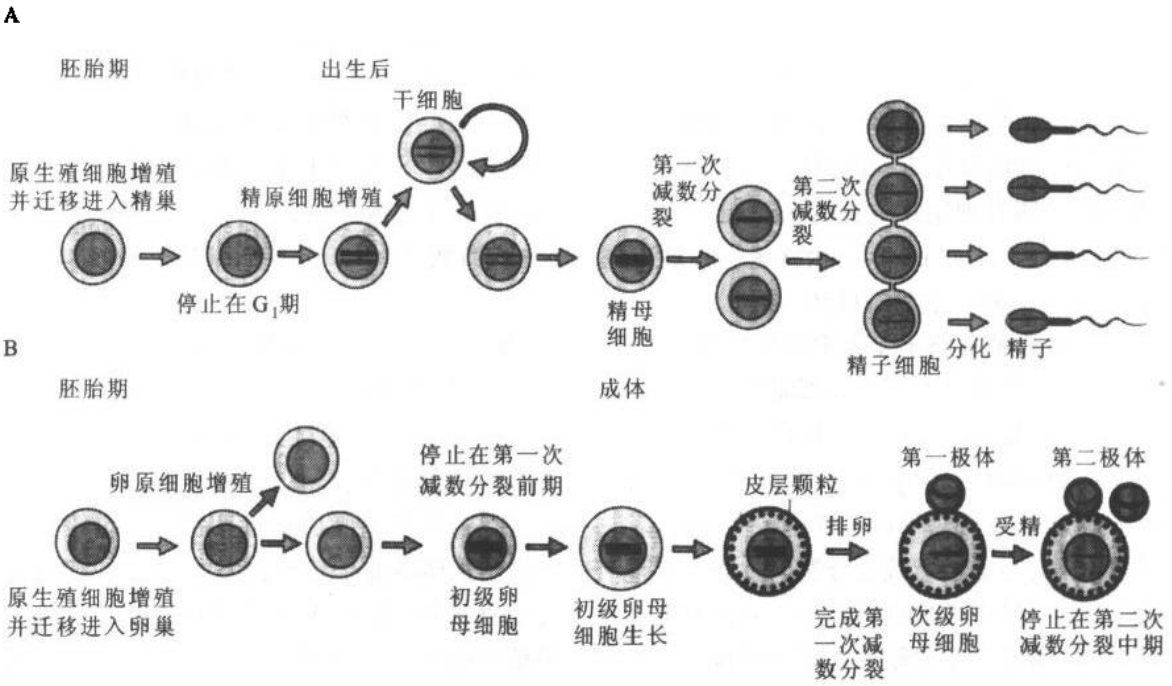


图 1.12　哺乳动物精子发生和卵子发生示意图

A. 示原生殖细胞进入胚胎精巢后停留在细胞周期的 G_1 期。在出生后它们重新开始进行有丝分裂形成干细胞群(精原细胞)，由精原细胞的后代——精母细胞进行减数分裂和精子发生。在精子发生中由一个精母细胞最终发育成为四个成熟精子　B. 示原生殖细胞进入胚胎卵巢后分化成为卵母细胞，通过几次有丝分裂进入第一次减数分裂前期。此时不再进行细胞增殖，卵母细胞迅速生长，其体积增加约 100 倍。在成熟的雌性个体中，卵母细胞进一步发育并形成质膜下皮质颗粒层。由于卵巢内激素的作用，卵子继续成熟，以后停留在第二次减数分裂中期等待受精。第二次减数分裂的完成是在受精以后。经过减数分裂，一个卵母细胞形成一个卵子和两个极体

与精子发生相比，卵母细胞发生的机制在各种动物之间差异更大，这与各种动物生殖方式的差异有关。雌海胆和雌蛙每次产卵数高达数百至数千个，而人类和大多数哺乳动物每次只产一个或几个卵，个体在一生中所排卵的总数也很少。产卵量比较大的动物，它们的卵原细胞(oogonia)在整个生命周期中能够分裂产生大量的生殖干细胞。每次排卵量很少的动物的卵原细胞的增殖只发生在早期，在以后的发育阶段由卵原细胞通过分裂形成一定数量的前体细胞。人类妊娠 2～7 个月间胚胎的卵原细胞由 1 000 个左右迅速分裂达到约 700 万个，但在第 7 个月以后胚胎卵原细胞的数目急剧下降(图 1.13)。在这个阶段，大多数的卵原细胞死亡，存活者则进入第一次减数分裂前期分化成初级卵母细胞(primary oocyte)。在第一次减数分裂前期，初级卵母细胞不断发育，直到双线期发育被阻断。这种阻断的情况一直维持到青春期。随着青春期的开始，一批又一批的初级卵母细胞阶段性地恢复减数分裂。因此，人类女性卵母细胞减数分裂在胚胎阶段就已经开始，而直到 12 岁左右才获得恢复减数分裂的信号。事实上有些卵母细胞阻断于减数分裂前期长达约 50 年。即使在出生后，卵母细胞仍在不断死亡。在出生时大概有几百万个初级卵母细胞，但在女性的一生中大概只有 400 个卵母细胞能够继续完成成熟分化。

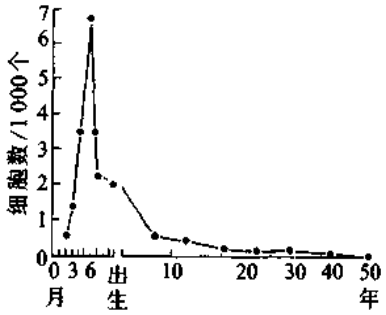


图 1.13 人类卵巢中生殖细胞数目的变化

与精母细胞减数分裂相比，卵母细胞减数分裂的另一个特征是两次成熟分裂都并非是均等分裂。初级卵母细胞在第一次减数分裂终期产生两个子细胞：一个几乎不含细胞质的小细胞和另一个几乎拥有所有细胞质成分的大细胞。大细胞称为次级卵母细胞(secondary oocyte)，小细胞称为第一极体(first polar body)。由次级卵母细胞进行第二次减数分裂，产生一个拥有大部分卵质的成熟卵子(ovum)和一个第二极体(second polar body)。

有些动物种群卵子发生中减数分裂发生明显的变异，以至于产生二倍体的配子，不需要受精就能够发育，这种繁殖方式称为孤雌生殖(parthenogenetic)。果蝇(*Drosophila mangabeirai*)在第二次减数分裂后，其中产生的一个极体作为精子，与卵子结合“受精”。其他昆虫(如 *Moraba virgo*)和蜥蜴(*Cnemidophorus uniparens*)在减数分裂前，卵原细胞的染色体数目增加一倍，通过减数分裂，染色体正好恢复成为双倍体。蚱蜢(*Pycnoscelus surinamensis*)的生殖细胞通过两次有丝分裂形成双倍体的卵子，却不经历减数分裂的过程。其他有些动物单倍体雄性生殖细胞的发生，不仅仅为了进一步繁殖，而且作为性别决定的一种机制。如膜翅目动物蜜蜂、黄蜂、蚁的单倍体未受精卵发育为雄性个体，而双倍体受精卵发育为雌性个体。这类单倍体雄性个体的精子发生不经历第一次成熟分裂而直接经过第二次成熟分裂产生两个精子。

二、两栖类卵母细胞的成熟

由于卵子需要负责发育的启动和指导早期发育，在卵质中积累和贮存着大量物质，包括能源、细胞器、酶、核酸、结构蛋白和蛋白质合成前体分子及卵黄等。卵质中的这些物质主要在减数分裂前期Ⅰ的过程中产生和积累。前期Ⅰ又可分为卵黄形成前期和卵黄形成期。

鱼类和两栖类的卵子由生殖干细胞——卵原细胞分化而来，每年产生一群新卵子。豹蛙(*Rana pipiens*)卵子发生持续长达 3 年时间，在这期间卵母细胞可以得到充分的生长和进行物质

积累。前两年卵母细胞的体积缓慢地长大，到了第三年，由于卵黄的迅速积累，卵母细胞的体积迅速增大。每年有一批卵子成熟。当卵母细胞到达减数分裂前期的双线期时，卵黄发生开始，这也是卵母细胞核灯刷状染色体迅速合成 RNA 的阶段。卵黄是提供胚胎营养的一种混合物。卵黄的一个主要成分是相对分子质量为 4.7×10^5 的卵黄蛋白原(vitellogenin)，这种蛋白质主要在肝脏中合成，通过血液循环进入卵巢，再经过卵巢滤泡细胞间转运和借助胞饮作用进入卵母细胞。在成熟卵中，卵黄蛋白原被裂解成两种蛋白质——卵黄高磷蛋白和卵黄磷脂蛋白，两者包装在一起，进入膜结合的卵黄小板。卵黄中的糖原颗粒和脂质体分别贮存糖类和脂肪成分。

在卵子发生中，卵子的极性是明显的。为了研究方便，设定动物极和植物极之间的连线为卵轴(egg axis)。由于卵质内含物质的不均匀分布，大多数的卵子是高度不对称的。在有的动物成熟卵中，植物极卵质中卵黄的浓度是动物极的 10 倍，但是卵子的整个表面质膜对卵黄蛋白原的摄入是均一的。产生不均匀分布的原因是卵黄小板在卵内的移动(图 1.14)。在动物半球形成的卵黄小板向细胞的中心方向移动，而在植物极形成的卵黄小板运动不活跃，停留于卵子植物极的胞质下很长一段时间，并且体积不断增大。随着新的卵黄蛋白原由细胞表面不断摄入，许多新的卵黄小板慢慢从皮质中转移到细胞中心和植物极。由于卵黄小板在细胞内运动的差异，植物极卵黄慢慢地积累。非洲爪蟾成熟卵中 75% 的卵黄位于植物极，关于这种转运的机制还不清楚。随着卵黄的积累，细胞器也形成不对称的排列方式，这是由高尔基体转变成皮质颗粒的过程开始的。起初皮质颗粒随机分散在整个细胞质内，以后迁移到周围细胞质。此时线粒体复制也已开始，分裂形成大量的线粒体，以供卵裂时分配到不同的子细胞中去。非洲爪蟾在原肠胚形成开始之前不再形成新的线粒体。随着卵黄发生接近结束，卵质开始分层，皮质颗粒、线粒体和色素颗粒主要位于周围的细胞质中，形成卵的皮质。在内层的卵质中也出现不同的梯度分布，当卵黄小板在植物极开始积累和浓缩的同时，糖原颗粒、核糖体、脂质体及内质网等都往动物极移动。贮存 mRNA 的蛋白颗粒开始在卵内定位。

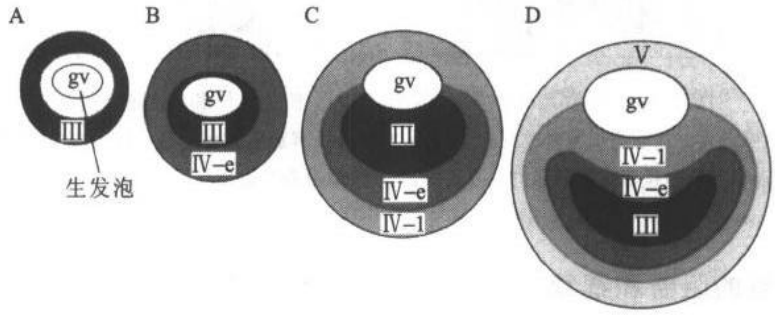


图 1.14　非洲爪蟾(*Xenopus*)卵母细胞卵黄小板动－植物极性的建立

A. 第Ⅲ期晚期的卵母细胞(直径约 600 μm)，卵黄蛋白原在整个卵表均一摄入　B～C. 随着卵母细胞的生长，卵黄蛋白原继续在整个卵表均一摄入和形成卵黄小板，同时动物极的卵黄小板向植物极转运，而植物极的卵黄小板保持在原位不动　D. 最初形成的卵黄小板(Ⅲ)已全部位于植物半球，卵母细胞中约占 75% 的卵黄小板集中到植物半球中。图中罗马数字Ⅲ示第Ⅲ期卵黄小板；Ⅳ－e 和Ⅳ－1 分别示第Ⅳ期早期和晚期卵黄小板；Ⅴ示第Ⅴ期卵黄小板；gv 示生发泡

建立上述这些梯度的机制目前还不能完全阐明，但利用一些抑制剂进行研究的结果表明，细胞

骨架在指导特异性 mRNA 和图式形成相关因子的定位中起关键性的作用。如 *Vg1* 基因的 mRNA 是通过两个步骤转移到植物极皮质中的:第一步,微管把 *Vg1* mRNA 带入植物半球;第二步,由微丝负责把 *Vg1* mRNA 固定到皮质区。

非洲爪蟾减数分裂的细线期持续 3~7 天,偶线期 5~9 天,粗线期约为 3 周,而双线期则能持续几年,但是仅有一部分双线期卵母细胞进入卵黄发生阶段。在卵黄发生结束后,使核膜破裂的信息产生,这是通过丘脑下部、垂体、滤泡细胞之间的激素相互作用进行调控的(图 1.15)。当丘脑下部接受到交配季节来临的信号后,释放促性腺激素释放素,促进垂体释放促性腺激素,后者进入血循环并促进滤泡细胞释放雌激素,雌激素指导肝合成并释放卵黄蛋白原。在雌激素的刺激下肝细胞发生急剧的变化。这些变化通常于每年的交配季节产生,但在非交配季节给成年蛙(无论雌雄)注射雌激素,也同样能够引起这种变化并释放卵黄蛋白原。在雌激素释放之前,肝中检测不到卵黄蛋白原 mRNA;雌激素作用后,每个肝细胞中约含 50 000 个卵黄蛋白原 mRNA,占细胞总 mRNA 的一半。同时,雌激素还能特异性地提高卵黄蛋白原 mRNA 的稳定性,使其存活的时间由原来的 16 小时提高至 3 周。这种效应是雌激素直接作用的结果,雌激素通过转录和翻译水平的调控来控制卵黄蛋白原的合成和积累。

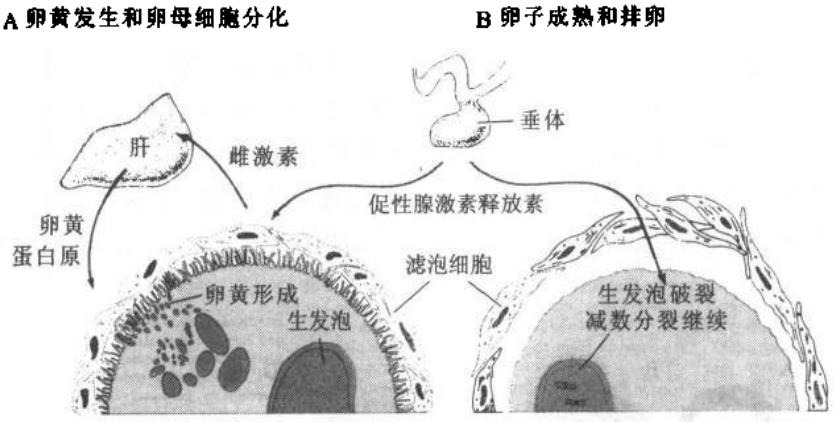


图 1.15　雌激素和孕酮对两栖类卵母细胞生长和成熟的调控

A. 促性腺激素促进滤泡细胞释放雌激素,雌激素指导肝释放卵黄蛋白　B. 在卵黄发生期之后促性腺激素促进滤泡细胞释放孕酮引起生发泡破裂,完成减数分裂并排卵

三、减数分裂的阻断和继续

两栖类的卵母细胞在减数分裂前期的双线期能停留长达几年之久。孕酮能促进两栖类卵母细胞继续减数分裂(图 1-15)。在孕酮刺激 6 小时后卵母细胞核膜破裂,核仁消失,灯刷状染色体上向外伸出的 DNA 环也缩回并迁移至动物极开始分离,接着第二次减数分裂发生,进行排卵,成熟卵从卵巢中释放出来。此时的成熟卵处于第二次减数分裂的中期。

关于孕酮的作用机制已基本阐明。一种蛋白质激酶促成熟因子(maturation promoting factor, MPF)可使阻断的减数分裂继续进行,细胞周期蛋白(cyclin)参与 MPF 活性的调控。MPF 的活性是周期性的:当细胞处于分裂期时,MPF 具有活性;而当细胞处于分裂间期时,则检测不到 MPF 活

性。细胞周期蛋白在细胞分裂间期翻译，到细胞分裂时又迅速降解。如果细胞周期蛋白不降解，MPF 则保持其活性，细胞停留在细胞分裂的中期；一旦细胞周期蛋白降解，MPF 失活，细胞就回到细胞分裂间期。孕酮能够引起卵母细胞继续减数分裂的原因，是由于孕酮可使卵内一种贮存的 mRNA 开始翻译。这种 mRNA 编码一种与 *mos* 原癌基因同源的磷蛋白分子，其相对分子质量为 3.9×10^4，称为 $pp39^{mos}$。$pp39^{mos}$只有在卵子成熟过程中能够检测到，而且在受精后迅速消失。$pp39^{mos}$对于卵母细胞减数分裂继续进行起着重要作用。如果注射 *mos* mRNA 的反义核苷酸入卵，抑制 $pp39^{mos}$的翻译，核膜破裂和卵子成熟就不能发生。目前认为 $pp39^{mos}$通过抑制一种专一性降解细胞周期蛋白的蛋白酶来抑制细胞周期蛋白的降解。由于细胞周期蛋白没有被降解，MPF 活性得以维持，细胞进入分裂中期，而且直到 MPF 失活前，细胞一直处于分裂中期。在受精过程中 $pp39^{mos}$被降解，MPF 活性下降，这是另一种蛋白酶活化的结果。在受精时钙离子从内质网释放出来，这些游离的钙离子能够激活蛋白酶 calpain Ⅱ，后者能特异性裂解 $pp39^{mos}$。因此，在接受孕酮刺激后卵内 $pp39^{mos}$迅速升高，使卵母细胞恢复减数分裂。但是一旦 calpain Ⅱ 活化，$pp39^{mos}$水平就急剧下降。因此孕酮诱发的减数分裂在受精后才完成。

四、卵母细胞的基因转录

在直径为 25～40μm 的第Ⅰ期非洲爪蟾卵母细胞中转录活动就已经开始。到减数分裂的双线期阶段，所有早期发育包括原肠胚形成阶段所需的 rRNA 和 tRNA 都已完成转录并贮存，所有母型 mRNA 也都已转录(图 1.16)。在非洲爪蟾中，这个阶段要持续几个月。当卵母细胞长到一定的大小时(第Ⅵ期)，长足卵的染色体开始凝集，基因的转录活动也不再活跃。这种情况再维持几个月，以后在激素刺激下，卵母细胞完成第一次减数分裂并排卵，同时卵质中贮存的 mRNA 进入核糖体并开始翻译。

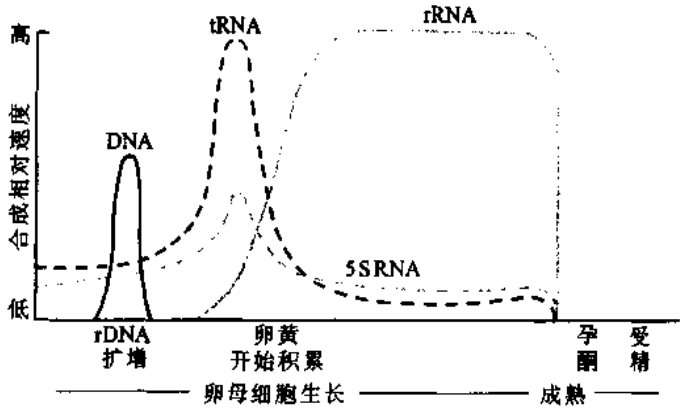


图 1.16　两栖类卵子发生在排卵前最后 3 个月中 DNA、RNA 合成的相对速率

在蛙的卵子发生中，卵母细胞 mRNA 的复杂性和 mRNA 含量基本保持恒定，即使在灯刷状染色体阶段 mRNA 迅速增加，也因为有一部分 mRNA 降解而使其含量达到平衡。蛙的卵母细胞由于受孕酮的影响，在准备排卵时就开始进行母源性 mRNA 的翻译。海胆卵子发生中的情况与蛙不同。海胆卵母细胞 mRNA 的复杂性和 mRNA 含量都随着卵母细胞的成熟而增加，同时，海胆母源

性 mRNA 的翻译是在受精时才被启动。

与某些精子的 mRNA 类似，蛙卵母细胞的一些 mRNA 的 3′末端通过加 poly(A)尾之后具备翻译活性。在孕酮的作用下，卵母细胞生发泡破裂后不久，卵质中一组 mRNA 的 poly(A)尾延长 50～300 个碱基，但是这些 mRNA 翻译后立即降解。此时，poly(A)尾的信号有两种：一种是经典的 AAUAAA poly(A)增加序列，另一种是在 3′末端非翻译区的特异性 UUUUUAU 序列。后一种信号在孕酮引起卵母细胞成熟的过程中能作用于任何 mRNA，使之具有翻译能力。在哺乳动物卵子成熟过程中也存在同样的情况。血浆纤维蛋白原的活化因子可能是哺乳动物排卵过程中合成的一种重要蛋白酶，在减数分裂被阻断的初级卵母细胞中，其 mRNA 以非翻译状态贮存。随着减数分裂恢复进行，这种蛋白酶 mRNA 的 3′末端被 poly(A)化，随即翻译成为蛋白质。

五、昆虫的卵子发生

有些昆虫(如果蝇)以滋养型方式进行卵子发生。果蝇的卵子起源于卵巢内的生殖系干细胞，每个生殖系干细胞分裂一次产生一个干细胞和一个成胞囊细胞(cytoblast)。一个成胞囊细胞经过 4 次不完全的有丝分裂形成一个 16 细胞的胞囊(cyst)，细胞之间通过细胞质桥相互连接构成合胞体，其中只有位于胞囊后端的一个细胞形成卵母细胞，其余 15 个细胞则形成滋养细胞(图 1.17)。滋养细胞的核 DNA 经过多次复制，形成多倍体的核。由于滋养细胞多倍体核的高转录活性，可合成和提供卵子发育所需的 RNA 和蛋白质。这些母源性产物在卵子发生中转运到卵母细胞中去。果蝇成熟卵中的全部物质都是母体基因组的产物。这些在卵子发生过程中表达并在卵子发生及早期胚胎发育中具有特定功能的基因称为母体效应基因(maternal－effect gene)。而在受精后才表达的胚胎基因称为合子基因(zygotic gene)。卵母细胞经过减数分裂形成单倍体的卵子。胞囊外包围着体细胞起源的滤泡细胞，由滤泡细胞产生卵黄膜和壳膜。胞囊连同包围着它的滤泡细胞称为卵室(egg chamber)。卵室与卵室之间相连，呈现出芽状的卵巢管(ovariole)结构(图 1.18)。在卵子发生后期，起源于卵室前端的 6～10 个细胞穿过滋养细胞迁移到卵子前端，称为边缘细胞(border cell)。

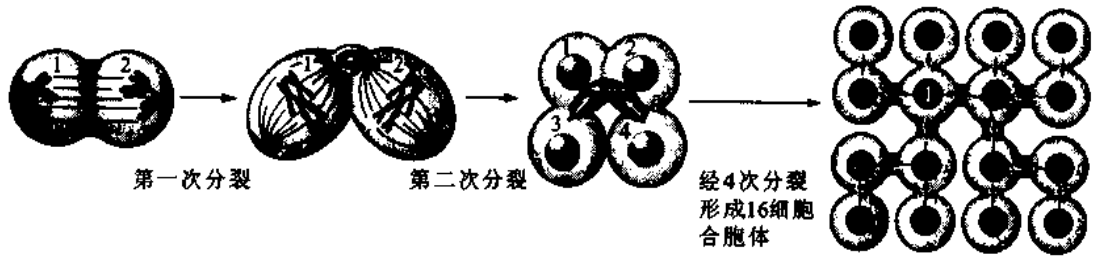


图 1.17 果蝇卵子发生初期示意图

果蝇卵子发生的初期在卵巢中进行，起源于卵巢一端的生殖系干细胞经过 4 次分裂形成由细胞质桥相互连接的 16 细胞合胞体。其中只有位于胞囊后端的一个细胞形成卵母细胞，其余 15 个细胞则形成滋养细胞

滋养型卵子发生比较特殊，既不经历转录活跃阶段也没有灯刷状染色体，大量的 RNA 都在滋养细胞中合成，然后转运到卵母细胞中。卵母细胞的发生持续 12 天，在这段时间中滋养细胞的代谢十分活跃。滋养细胞通过染色体的大量复制，使其转录活性升高。在复制率高的细胞中，甚至可

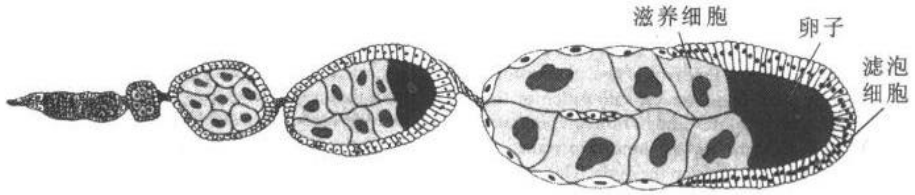


图 1.18　成体果蝇的卵巢管

由滤泡细胞包被滋养细胞和卵细胞形成卵室，卵室之间相连，呈现出芽状卵巢管结构

达到 512 套染色体拷贝。rRNA 和 mRNA，甚至是完整的核糖体都能由滋养细胞产生，再向卵母细胞中转运。在滋养型卵子发生中，虽然所有的细胞是相连的，即 RNA 和蛋白质能在细胞之间自由地穿梭和转运，但是这些细胞却有着不同的发育命运。它们中只有一个细胞能够发育成为卵母细胞，RNA 和蛋白质只向一个方向转移。这是因为在卵室内存在电荷梯度，它能促进一些分子扩散和阻止另一些分子的扩散，促进一些酸性大分子的定向运动和抑制大多数蛋白质运动。将荧光标记的酸性酶注射进滋养细胞，能观察到标记的酸性酶穿过滋养细胞进入卵母细胞；如果用简单的化学修饰将标记的酸性酶变成碱性蛋白后再注射入滋养细胞，标记物不能迁移。在相互连接的细胞之间，除了一些蛋白质和核酸能定向转移之外，发育的信息并不相互交换，所以能够保证细胞各自发育的命运。

果蝇卵子在产出之前受精，受精后细胞核立即进行快速的连续分裂，但细胞质不分裂，形成一个合胞体胚盘(syncytial blastoderm)。在细胞核的第 9 次分裂过程中，约有 5 个核迁移到胚胎后极，开始具有细胞膜包围形成第一批细胞，称为极细胞，这些细胞将发育为生殖细胞。

果蝇有三种卵黄蛋白是在脂肪体和卵巢中合成，而并不是在卵母细胞中合成。参与卵黄合成调控的激素是保幼激素、蜕皮激素和由脑释放的神经释放激素(图 1.19)。在环境因素的作用下，脑释放神经释放激素，促进咽侧体释放保幼激素。保幼激素的功能是调控卵细胞表面对卵黄蛋白原的摄入，促进卵巢卵黄蛋白的合成，促进卵巢滤泡细胞和腹壁细胞释放蜕皮激素。蜕皮激素通过代谢形成其活性形式 20－羟基蜕皮素，后者能促进脂肪体合成卵黄蛋白。虽然在果蝇卵子中卵黄位于中央胞质内，但果蝇卵细胞也存在极性。由于进入卵质的母源性产物的不均匀分布，使卵子产生前后轴的极性。如 *bicoid* 基因在滋养细胞中转录，其 mRNA 转移进卵母细胞后在卵子前端积累。如果去掉野生型卵的部分前端卵质，将发育成缺失头部结构的胚胎，表明母源性 *bicoid* 基因的产物对于果蝇卵子的极性和胚胎的前后轴形成具有重要作用(见第八章)。

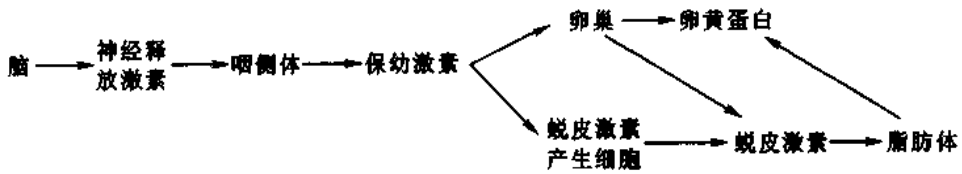


图 1.19　果蝇卵黄蛋白合成的激素调控

在脑释放的神经释放激素的作用下，咽侧体产生保幼激素；后者可促进卵巢卵黄蛋白的合成和导致卵巢滤泡细胞和腹壁细胞释放蜕皮激素；蜕皮激素能促进脂肪体合成卵黄蛋白并转运到卵巢

在研究果蝇卵内这种极性维持的机制过程中，发现 *bicoid* 的 mRNA 中有控制其定位的顺式元件。*bicoid* 的 mRNA 显然是通过其 3′末端非翻译区固定于卵子的前部元件上。mRNA 的末端通过碱基的自身配对产生二级结构的特征。如果在其他 mRNA 的 3′末端加上同样的序列也能被定位于果蝇卵的前端。其他两个母性效应基因 *Swallow* 和 *exuperantia* 分别是使 *bicoid* mRNA 固定于卵前极和使生殖质颗粒成分固定于卵后极的调控基因。这些基因是 *bicoid* 定位的反式元件。*bicoid* mRNA 在这两个基因突变母体所产的卵中扩散到卵后端，而另一个极颗粒元件 *vasa* 基因的产物也不定位于后极。果蝇卵巢不仅合成使卵子细胞质产生极性的因子，而且也合成一些调控它们极性化的卵子内元件。

六、人类卵母细胞的成熟和排卵

哺乳动物卵的成熟和排卵(ovulation)主要有两种方式。一种排卵方式是通过交配生理活动的刺激而完成。对子宫颈的生理刺激导致垂体释放促性腺激素，在激素指导下大多数的交配都能形成受精卵，如家兔、水貂等动物采用这种方式。大多数哺乳动物采用周期性排卵的方式。雌体只在一年中某特定的动情期排卵。在这种情况下，环境因素，主要是光照种类与照射的时间，刺激下丘脑释放垂体促性腺释放因子，后者又促进垂体释放促卵泡激素(follicle-stimulating hormone，FSH)和黄体生成素(luteinizing hormone，LH)，导致滤泡细胞增殖并释放雌激素。雌激素通过神经元支配一些种群的动物发生交配行为。促性腺激素还刺激滤泡增殖并启动排卵。因此动情和排卵基本上是同步发生。

人类具有与其他灵长类动物相同的生殖生理特征。成熟女性有排卵周期(约 29.5 天)，但没有明显的动情季节。灵长类卵子的成熟和排卵的阶段性称为月经周期。月经周期是以下三个方面活动的综合表现：① 卵巢周期使卵子成熟和排卵；② 子宫周期为发育中的胚泡着床提供合适的环境；③ 子宫颈周期使精子只能在某一适当的时间进入女性生殖道。这三个周期是通过垂体、下丘脑、卵巢所释放的激素综合协调控制的。

在成年女性卵巢中，大多数的卵母细胞被阻断在第一次减数分裂前期的双线期阶段。每个卵母细胞都由一个初级卵泡包裹，初级卵泡是由单层滤泡上皮细胞和无规则的间质壁细胞构成。一批初级卵泡阶段性地进入卵泡生长阶段。在这个阶段，卵母细胞的体积增加约 500 倍，卵母细胞的直径由初级卵泡中的 10 μm 左右增大到充分发育卵泡中的 80 μm 左右。随着卵母细胞的生长，滤泡细胞的数目也增加，围着卵母细胞形成多层同心圆(图 1.20)。在卵泡形成过程中，卵泡中形成一个由滤泡细胞围成的腔，其中充满蛋白质、激素、cAMP 和其他分子的混合物。发育到一定阶段的卵泡只有在适当的时间受到促性腺激素的刺激之后，卵母细胞的成熟过程才能继续。月经周期的第一阶段(即增殖期或滤泡期)，垂体开始释放大量的 FSH。正在发育中的卵泡受 FSH 刺激进一步生长和进行增殖，同时 FSH 也引起滤泡颗粒细胞表面 LH 受体形成。在滤泡开始生长后不久垂体就释放 LH，在 LH 的刺激下卵母细胞开始恢复减数分裂，核膜破裂，染色体凝集，直到完成第一次减数分裂，形成一个卵子和一个极体，两者都包在透明带内。此时卵被排出卵巢。以上两种促性腺激素协同作用，导致滤泡细胞分泌雌激素的量增加(图 1.21)。在调控月经周经的过程中，雌激素至少有以下五个方面的作用：① 引起子宫黏膜开始增殖，促进其中血管的形成；② 引起宫颈黏液变稀，使精子能进入生殖道的深部；③ 在引起垂体降低 FSH 产生的同时，使滤泡细胞表面的 FSH 受体数目增多，同时促进滤泡细胞释放多肽激素抑制因子，抑制垂体释放FSH；④在低浓度时

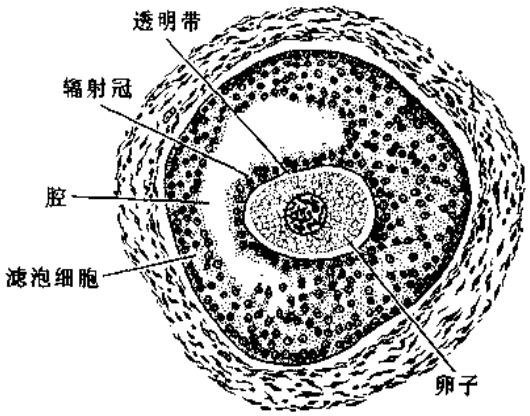


图 1.20　哺乳动物的成熟卵泡
卵母细胞由多层呈同心圆排列的滤泡细胞包围

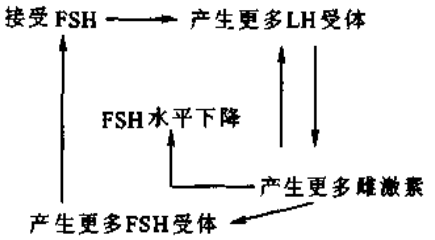


图 1.21　哺乳动物滤泡细胞的正反馈调控
滤泡细胞接受 FSH 刺激产生更多的 LH 受体，后者促进滤泡细胞产生雌激素，雌激素能促进 LH 受体产生，同时使垂体产生的 FSH 水平下降。结果只有极少数卵泡能获得少量 FSH，增加其接受 LH 的能力，所以只有极少数卵母细胞能够成熟

抑制 LH 的产生，但在高浓度时刺激 LH 的产生；⑤ 在长时间持续极高浓度时，雌激素作用于下丘脑，引起后者分泌促性腺素释放因子。因此，雌激素升高的结果是引起滤泡的产生和 FSH 水平的下降，而 LH 水平却随着雌激素水平的增加而升高，滤泡细胞也持续生长。从第 10 天开始，雌激素的释放迅速升高。月经周期中期，在雌激素升高并维持高水平的情况下，出现一个 LH 大量合成和 FSH 少量合成的峰(图 1.22)。

目前对于排卵的详细机制还不清楚，但卵子由卵泡中排出显然与 LH 引起卵泡中胶原酶、纤维蛋白溶原酶活化因子和前列腺素浓度的升高相关。纤维蛋白溶原酶活化因子的 mRNA 一直以无活性的形式存在于卵质中，LH 能引起这种 mRNA poly(A)化，并翻译成活性很高的蛋白酶。前列腺素可能引起卵巢内部平滑肌的收缩，如果卵巢中前列腺素的合成受到抑制就不发生排卵。除了前列腺素导致的压力增加外，胶原酶和纤维蛋白溶原酶活化因子对卵泡细胞外基质的疏松和消化作用也很重要。黄体化激素所带来的效应是增加卵泡的压力和降解卵泡壁，在卵将要排出的位置消化卵泡壁形成洞以便排卵。排卵后即开始黄体期，卵泡破裂的残余细胞在 LH 的持续影响下形成黄体。由于 FSH 能促使这些残余细胞形成很多 LH 受体，故能持续对 LH 作出反应。黄体除了释放激素之外，主要释放孕酮，后者能促进子宫壁增厚及其中血管的生长，为胚泡的着床作准备。孕酮还能抑制 FSH 的产生进而抑制更多卵泡和卵的成熟。利用上述原理，用雌激素和孕酮结合制备避孕药，可阻断孕酮的受体，防止子宫壁的增厚和胚泡着床。如果卵子没有受精，黄体将退化，孕酮释放也停止，子宫内膜剥落。随着血清中孕酮水平的下降，垂体重新开始合成 FSH，月经周期又重新开始。如果卵子受精，滋养层释放的催乳素能维持黄体的活性，使血清孕酮维持在高水平。月经周期不仅使人类的卵子阶段性地成熟和排卵，同时还使子宫发育成为能养育胚胎的器官。

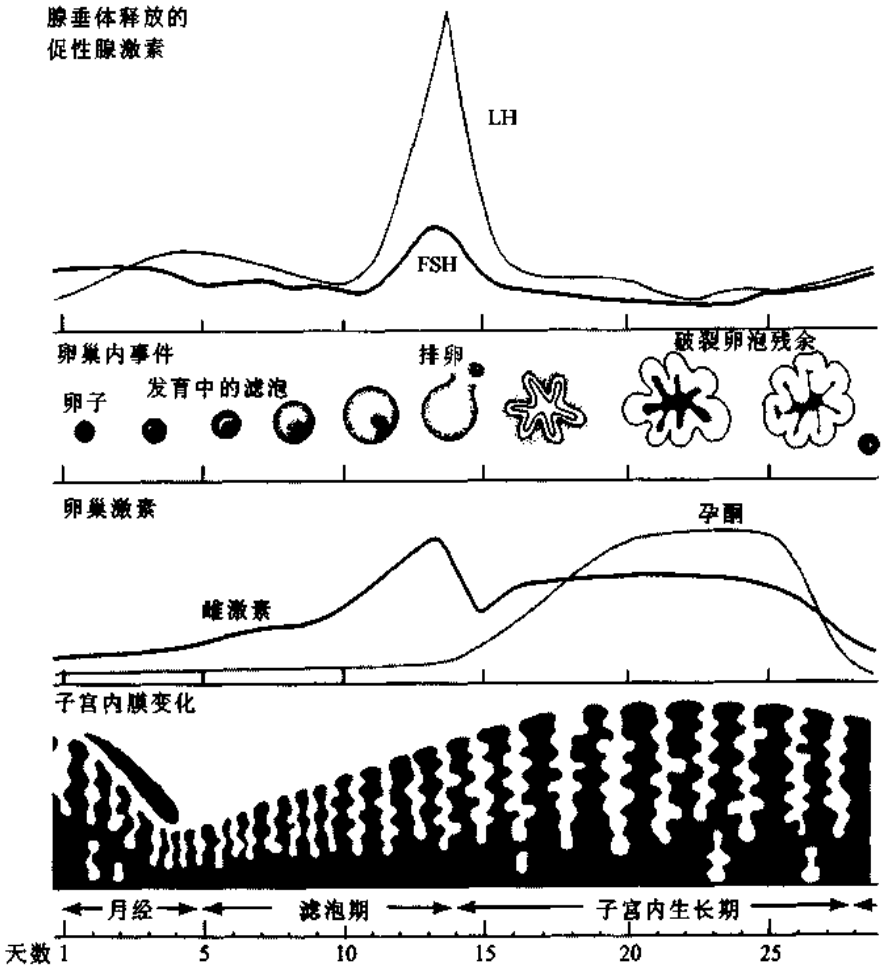


图 1.22 人类的月经周期

卵巢内的事件和子宫内膜周期的协调是由垂体和卵巢的激素所调控的。在滤泡期，当卵泡内的卵子成熟时，子宫内膜已做好接纳胚胎的准备。成熟卵子大约在第 14 天释放。如果胚胎没有着床，子宫内膜开始脱落，引起月经来潮

参考文献

1 Anderson R, *et al*. Mouse primordial germ cells lacking b1 integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. Development, 1999, 126: 1655～1664

2 Austin J, Kimble J. *glp－1* is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*. Cell, 1987, 51: 589～599

3 Blackler A W. Transfer of primordial germ cells between two subspecies of *Xenopus laevis*. J. Embryol. Exp. Morphol., 1962, 10: 641～645

4 Broihier H T, *et al*. *Zfh－1* is required for germ cell migration and gonadal mesoderm development in *Drosophila*. Development, 1998, 125: 655～666

5 Brown D D, Dawid I B. Specific gene amplification in oocytes. Science, 1968, 160: 272～280

6 Cooley L, Theurkauf W E. Cytoskeletal functions during *Drosophila* oogenesis. Science, 1994, 266: 590～596

7 Dym M. Spermatogonial stem cells of the testis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91: 11287～11289

8 Eyal－Giladi H, Ginsburg M, Farbarou A. Avian primordial germ cells are of epiblastic origin. J. Embryol. Exp. Morphol., 1981, 65: 139～147

9 Godin I, Wylie C, Heasman J. Genital ridges exert long－range effects on primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. Development, 1990, 108: 357～363

10 Hall D H, *et al*. Ultrastructural features of the adult hermaphrodite gonad of *Caenorhabditis elegans*: Relationship between the germ line and soma. Dev. Biol., 1999, 212: 101～123

11 Heath J K. Mammalian primordial germ cells. Dev. Mammals., 1978, 3: 272～298

12 Howard K. Organogenesis: *Drosophila* goes gonadal. Curr. Biol., 1998, 8: R415～R417

13 Kuwana T. Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal anlage. Dev. Growth Diff., 1993, 35: 237～243

14 Roller R J, *et al*. Gene expression during mammalian oogenesis and early embryogenesis: Quantification of three messenger RNAs abundant in full grown mouse oocytes. Development, 1989, 106: 251～261

15 Savage R M, Danilchik M V. Dynamics of germ plasm localization and its inhibition by ultraviolet irradiation in early cleavage *Xenopus* eggs. Dev. Biol., 1993, 157: 371～382

16 Subtelny S, Penkala J E. Experimental evidence for a morphogenetic role in the emergence of primordial germ cells from the endoderm of *Rana pipiens*. Differentiation, 1984, 26: 211～219

17 Wylie C C, Heasman J. Migration, proliferation, and potency of primordial germ cells. Semin. Dev. Biol., 1993, 4: 161～170

18 Yisraeli J K, Sokol S, Melton D A. A two－step model for the localization of a maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: Involvement of microtubules and microfilaments in translocation and anchoring of *Vg1* mRNA. Development, 1990, 108: 289～298

第二章　受精的机制

受精(fertilization)是两性细胞(生殖细胞)融合并创造出具备源自双亲遗传潜能的新个体的过程。受精过程包括两种不同的活动:性活动(源自双亲基因的组合)和复制活动(新生物体的产生)。因此,受精的第一个功能是将父母的基因传递给子代,第二个功能是在卵细胞质中激发一些确保发育正常进展的系列反应。

受精过程随动物物种而异,但一般都包含以下几个主要方面:卵母细胞成熟,精子获能,精卵间的接触和识别(包括向化性的距离效应),精子入卵(配子融合和遗传物质的融合)、卵的激活并开始发育。整个过程实为激素调控下的联级反应。本文就其包含的主要活动分述如下。

第一节　卵母细胞成熟

动物的长足卵母细胞长期停顿于第一次减数分裂的双线期。在适当的信号刺激下可以恢复减数分裂,直至第二次减数分裂中期,成为等待受精的成熟卵。未成熟卵停顿于第一次减数分裂双线期的机制可能依物种不同而异,但其减数分裂过程的恢复却是受外源信号的调控。

业已知诱发卵母细胞恢复减数分裂的固有信号随动物而异,海星卵的为 1 - 甲基腺嘌呤,两栖类的为孕酮,鱼类的为 17α,20β - 二羟 - 4 - 孕烯 - 3 - 酮(简写为 17α,20β - DHP),哺乳类动物的为 4,4 - 二甲基 - 5α - 胆甾基 - 8,14,24 - 三烯 - 3β - 酚(简写为 FF - MAS)。

在上述固有外源信号的刺激下,卵母细胞趋于成熟,其主要形态学标志为:核膜破裂(又称生发泡破裂,germinal vesicle breakdown ,简写为 GVBD),染色体凝聚,纺锤体形成和第一极体排出。在分子水平上,经外源信号处理后相继发生的重要变化为:卵母细胞内 cAMP 浓度下降,Ca^{2+} 浓度上升,蛋白质合成增加,蛋白质去磷酸化或磷酸化,促成熟因子(maturation promoting factor ,MPF)之类的生物活性物质出现。

卵母细胞成熟分裂恢复启动的活动发生在细胞周期的晚 G_2 相。根据外源信号能迅速导致卵母细胞 cAMP 含量下降的事实推测,在外源信号刺激之前,长足卵母细胞被一种依赖 cAMP 的蛋白激酶 A(protein kinase A,PKA)磷酸化的蛋白质控制着,使之停顿在第一次减数分裂的双线期。该蛋白去磷酸化之后,卵内蛋白质合成增加。

在翻译的蛋白合成产物中,最引人注目的是 $pp39^{mos}$。在长足卵母细胞质中贮存着母型 c - *mos* mRNA,经外源信号刺激,母型 c - *mos* mRNA 加 poly(A)尾,由此翻译出相对分子质量为 3.9×10^4 的磷蛋白 $pp39^{mos}$。该蛋白只在成熟过程中出现,受精后迅速降解。

一般认为,$pp39^{mos}$具恢复卵减数分裂并使之停顿在第二次减数分裂的作用,但是必须与 cdk2 激酶共同作用才能实现。故推测所谓的细胞静止因子(cytostatic factor,CSF)实由 $pp39^{mos}$和 cdk2 组成(图 2.1)。

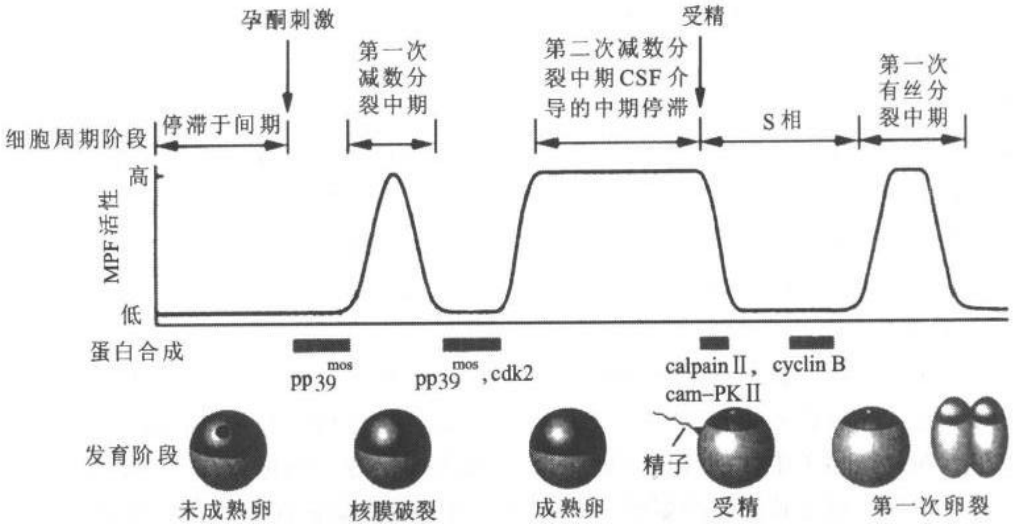


图 2.1 非洲爪蟾卵成熟分裂的机制

MPF 是由调节亚基 cyclin B 与催化亚基 $p34^{cdc2}$ 组成的，其活化不依赖于卵母细胞的转录水平，却依赖于翻译水平的活动。cyclin B 是一种周期性合成和降解的蛋白质，对 $p34^{cdc2}$ 的去磷酸化和磷酸化具调节作用。cyclin B 与预存在卵中但尚无激酶活性的 $p34^{cdc2}$ 结合在一起，形成低活性的 MPF 前体。在磷酸酯酶(*cdc*25 基因产物)的作用下，$p34^{cdc2}$ 的 Thr－14 和 Tyr－15 被去磷酸化，Thr－161 保持原有磷酸化的状态，成为具激酶活性的 MPF。在 MPF 作用下，细胞通过 G_2/M 进入 M 相(图 3.12)。

随着受精的发生，Ca^{2+} 内流，钙调蛋白激活，并进一步使依赖钙调蛋白的酪蛋白激酶Ⅱ(CKⅡ)活化。随着 CKⅡ的活化，c－*mos* 基因产物 $pp39^{mos}$ 降解，cdc2 激酶失活，从而 CSF 解体，受 CSF 保护的 cyclin B 降解，细胞周期由 M 相跨入 G_1 相。

第二节 精子获能

新射出的哺乳动物的精子不能使卵受精。为了获得受精的能力，射出的精子必须获能(capacitation)。精子获能是指射出的精子在若干生殖道获能因子作用下，精子膜发生一系列变化(如吸附于精子膜表面精液蛋白的去除，膜表面蛋白的重组等)，进而产生生化和运动方式的改变。获能后精子穿越卵母细胞周围的滤泡细胞和透明带的能力提高，这是精子发生顶体反应的前奏。

一、获能精子蛋白磷酸化和蛋白激酶活性的改变

在获能反应中，研究最透彻的激酶有依赖 cAMP 的 PKA、磷脂激活的蛋白激酶(PKC)和酪氨酸激酶。

1. PKA

在小鼠精子获能期间，腺苷酸环化酶活性和 cAMP 合成均增加。PKA 两种不同的抑制物——PKI 或 PKA 的调节亚单位可以抑制获能反应。获能反应也可被有生物活性的 cAMP 激动剂所诱

发。精子 cAMP 水平上升依赖于细胞外基质中 Ca^{2+} 和 HCO_3^- 的存在，PKC 的抑制物和 Ca^{2+} / 钙调蛋白依赖的蛋白激酶对 cAMP 浓度没有影响。

2. PKC

在哺乳动物精子中，PKC 参与精子运动和顶体反应的调控，但目前对其作用知之甚少。用佛波酯(phorbol ester)刺激 PKC 可加速精子的获能，这一反应可被 PKC 的抑制物所抑制。另外 PKC 还可能参与上皮生长因子诱发的获能反应。十四烷酰佛波醇乙酯(PMA)和二酰甘油(DAG)能刺激获能精子的顶体反应，这也有助于说明 PKC 参与获能反应。

3. 酪氨酸激酶

用抗磷酸化酪氨酸的抗体可从小鼠精子中鉴别出 3 种不同的磷酸化蛋白：52kDa 、75kDa 和 95kDa 蛋白。在所有实验条件下，95kDa 蛋白的酪氨酸残基总被磷酸化，而 52kDa 、75kDa 蛋白的酪氨酸残基只在获能精子中被磷酸化，故后两者可视为获能专一的标记分子。人精子也有类似的酪氨酸磷酸化情况。用抗磷酸化酪氨酸的抗体或者酪氨酸激酶活性的抑制物孵育精子，可以抑制精子穿透无透明带(ZP)的仓鼠卵，阻止顶体反应和阻断受精，但是酪氨酸激酶的抑制剂——制表菌素(erbstatin)却不能抑制经由精子与孕酮反应来衡量的获能反应。用免疫荧光标记磷酸化酪氨酸残基的方法显示出，获能精子酪氨酸的磷酸化程度增加，尤其是头部顶体区发生磷酸化的精子的数量增多。磷酸化酪氨酸荧光点出现在未获能的精子尾部，获能时移至顶体区。在精子膜上，只有少数蛋白的酪氨酸残基被磷酸化，其中相对分子质量为 $9.5\times10^4\sim9.7\times10^4$ 的蛋白的酪氨酸被高度磷酸化。在该相对分子质量区间中，发现有一种磷酸化蛋白能识别透明带 ZP3 的受体——ZRK。该蛋白已被部分克隆和测序。测序的结果显示，有 55% 同源于受体样蛋白酪氨酸激酶 c-cyk，97%～100% 同源于原癌基因 c-*mer*。该蛋白只存在于成熟精子和睾丸生精细胞中。在非还原性电泳条件下，有一种小鼠精子的酪氨酸磷酸化蛋白迁移至相对分子质量为 9.5×10^4 处，经测序，证实该蛋白与 HK1(hepatoma hexokinase)完全同源。该精子蛋白与抗大鼠脑 HK1 的抗血清起反应，并可被抗磷酸化酪氨酸抗体免疫沉淀。磷酸化的 HK1 酪氨酸位于精子头部，它具有一个类似于整合蛋白的胞外功能区。体外实验显示小鼠附睾精子在获能时，其蛋白酪氨酸磷酸化的增加依赖于培养基中的牛血清白蛋白(BSA)、Ca^{2+} 和碳酸氢盐，这些因子诱发获能反应完全依赖于 cAMP。

从人精液和妇女的卵泡液中检测到两种胸腺素肽——Tα1 和 Tβ4，其中 Tα1 可以提高人精子穿透仓鼠"裸露"卵的速率 。具正常生育能力的人的精液中，Tα1 的浓度要比无生育能力的高得多。相反，无生育力的人的精液中含有更高浓度的 Tβ4。Tα1 是通过增加结合于 ZP 的 95kDa 和 51kDa 两种精子蛋白的酪氨酸残基的磷酸化而提高获能。Tα1 只对未获能的精子膜蛋白的抽提物具磷酸化作用，对获能精子无磷酸化作用。

除了前述的 95～97kDa 蛋白，另一 51kDa 蛋白(称为受精抗原-1，FA-1)被认为是受体酪氨酸激酶，在获能反应中起重要作用。用抗 FA-1 的单抗处理人的精子，可以减少包括 95 kDa 和 51 kDa蛋白在内的蛋白磷酸化。在氧化条件下，精子蛋白的酪氨酸磷酸化水平可被提高，在还原条件下下降。

此外，包括 c-*ras* 基因产物、EGF-受体酪氨酸激酶和细胞周期特异性的 cyclin、cdc2 都存在于哺乳动物的精子中，但这些酶在精子获能反应中的作用尚不清楚，在获能精子中 cdc2 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性高水平表达。

二、源于雄性生殖道的受精促进肽

最近研究表明，受精促进肽(fertilization promoting peptide，FPP)在精子获能中起一定的作用。FPP 是一种由前列腺分泌到精液中的三肽($pGlu-Glu-ProNH_2$)。将 FPP 加入到未获能的小鼠或人的精子悬液中，可以实现获能反应和提高受精/穿透能力。FPP 还可抑制精子顶体的丢失，使精子维持比较高的受精能力。腺苷(adnosine)能调节腺苷酸环化酶的活性，对获能和未获能的两种精子产生的作用与 FPP 的作用相似。腺苷与 FPP 同时使用比单独使用其中一种的效果好，其两种不同受体分子的相互作用可以调节腺苷酸环化酶/cAMP 的信号传递途径。FPP 在结构上与促甲状腺素释放激素(thyrotrophin－releasing hormone，TRH)相似，与 TRH 抗体有交叉反应。早在 20 世纪 80 年代，用免疫学方法已检测出哺乳动物的前列腺和精液中含 TRH 类似物，但是直到 1989 年才从兔的前列腺复合物中分离出 TRH 类似物。随后进行了包括人、兔、啮齿类动物前列腺和/或精液中的 FPP 的研究。最新研究暗示 FPP 可能诱发与精子相关的生物学反应，可以最大限度保持精子的受精能力。

体外实验已经发现若干具生物学活性的 FPP 连接肽，其中使人最感兴趣的是 Gln－FPP($pGlu-Gln-ProNH_2$)，它存在于人类的输精管液中，能改变 FPP 和腺苷的生物学活性。Gln－FPP 存在于前列腺机能障碍的男子输精管内，在体内通常无明显的活性，但它能对 FPP 产生竞争性抑制效应。

由小鼠 *t－complex* 基因编码的蛋白 TCP－11 可能是 FPP 的受体。人类具有 TCP－11 的同源基因，提示 TCP－11 和 FPP 在生育/低生育力的人中起有一定作用。FPP 和 TCP－11 有刺激精子获能并随后抑制精子顶体丢失的作用，使获能精子数量达到最大，保证更多的顶体完整精子经雌性生殖道到达受精位点。根据已经分离出的人 TCP－11 同源物的分析结果，表明 TCP－11 在调节人的精子功能上发挥作用。人的低生育力似乎是由于 FPP 和/或 TCP－11 的丢失或结构的改变，导致附着于精子膜的 FPP 浓度下降所致。体外试验表明，FPP 的效应是刺激精子获能，减少由于受精延缓而导致胚胎发育和着床过程的异常。

第三节　精卵识别的分子基础

精卵识别(recognition of egg and sperm)有距离识别和接触识别之分，前者见于体外受精的水生生物。除了具向化性的距离识别效应，在受精过程中，精子与滤泡细胞、透明带(ZP)和卵质膜等在三个独立的水平上准确地相互作用。其中精子与 ZP 间的相互作用为专一反应，精子与透明带特异的 ZP 糖蛋白(小鼠 ZP3)结合，诱导顶体反应。顶体反应的重要作用在于释放顶体内的酶类和使精子膜成分重新分配、暴露或被修饰。精卵不仅互相粘附，同时进行膜融合，并诱发卵中的一系列信号转导，导致卵的激活和随后的发育。

一、精子的向化性

与哺乳类动物不同，许多水生生物将它们的配子直接释放入外界环境中。在这种情况下，精卵是如何识别并发生受精作用的？

现已在许多动物(如刺胞动物、软体动物、棘皮动物和尾索动物)中发现,其卵母细胞在完成第二次减数分裂后,可以分泌具物种特异性的向化因子,构成卵周特有的微环境,这种微环境不仅可以控制精子类型,而且可以使其适时完成受精。

向化因子的作用机制因物种不同而有些差异。其中了解最多的是从美国海胆的卵胶中分离出的一种含 14 个氨基酸的精子激活肽——resact。resact 的受体为跨膜蛋白,当 resact 与受体的胞外部分结合时,位于胞质内的鸟苷酸环化酶活化,cGMP 浓度上升;cGMP 浓度的增加使动力蛋白 ATPase 活化,从而刺激精子尾部的摆动,使精子向卵母细胞移动,适时与卵母细胞发生受精作用。

二、具受体功能的精子表面蛋白

获能精子在穿透 ZP 之前,必先附于 ZP 上。在各种动物中,已提出若干精子表面蛋白在结合 ZP 糖蛋白过程中起受体作用(表 2.1,图 2.2)。

表 2.1 起受体作用的精子表面蛋白

动物种类	受体
小鼠	β-1,4-半乳糖基转移酶
	岩藻糖基转移酶
	56 kDa 半乳糖结合蛋白(SP56)
	α-D-甘露糖苷酶(M_r 1.15×10^5,位于精子质膜上)
	95 kDa 蛋白(精子质膜蛋白)
大鼠	硫酸糖酯固定化蛋白
仓鼠	α-D-甘露糖苷酶
人	岩藻糖结合蛋白
	PH-20
	α-D-甘露糖苷酶
	甘露糖结合蛋白
	FA-1(受精抗原-1)
	精子凝集抗原-1
兔	RSA
	精子蛋白 17(SP17)
豚鼠	PH-20
	AM67

1. 半乳糖基转移酶

体细胞和精子均表达这种细胞表面酶,为一些细胞外的、终末端具 N-乙酰葡糖胺(N-acetylglucosamine,GlcNAC)的寡糖苷配体的受体。精子表面半乳糖基转移酶(GalTase)活性的提高和生育能力的提高相一致。活精子表面的 GalTase 能有选择地与 ZP3 作用,将半乳糖专一地转移到 ZP3。精子表面 GalTase 与其配体结合,能使精子 G 蛋白激活并诱导顶体反应。卵激活时皮质颗粒释放出来的 N-乙酰基糖酶能对 ZP3 上的 GalTase 结合位点进行修饰,由此阻断透明带外围的精子与受精卵或两细胞胚胎的透明带 ZP3 结合。

2. SP56(透明带附着分子,半乳糖结合蛋白)

位于顶体完整的精子头部,是小鼠精子中能与 ZP3 相结合的少数蛋白之一;它也和 ZP3 寡聚

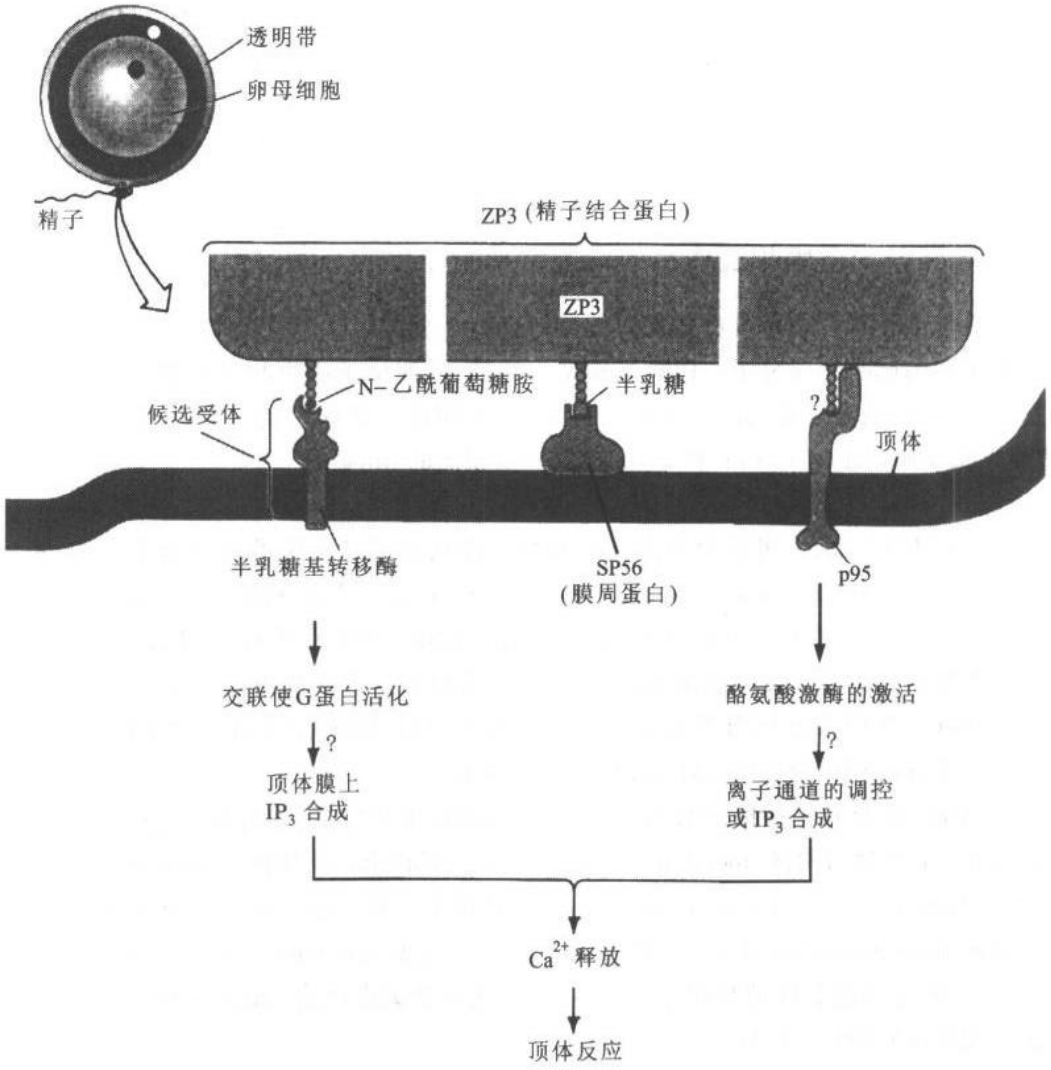


图 2.2　ZP3 通过精子表面蛋白(半乳糖基转移酶、SP56、p95)诱发顶体反应示意图

糖紧密结合，但不能与源自受精卵的 ZP 结合。最近研究表明，SP56 是一种睾丸独有的细胞膜蛋白，其 mRNA 仅能在精子细胞和精子中检测到。一种高度相关的小鼠 SP56 同源物存在于仓鼠中，而人和豚鼠中则没有。SP56 的推断氨基酸序列表明它含由 60 个氨基酸组成的重复序列，称 Sushi 域，因此它从属于一种包含涉及蛋白－蛋白相互作用的多种蛋白的超家族成员。SP56 有可能是结合 ZP3 上寡糖的一种外源凝集素，但尚未能确定它具有和外源凝集素性状显著同源的糖类识别区(CRDs)。有关 SP56 在精－卵结合起步中的生理作用尚需进一步探讨。例如，SP56 单抗是否干涉精－卵结合，以确定它是否存在于活精子表面；由于 SP56 是一种外周膜蛋白，它与发放信号通路连接的跨膜蛋白是否有联系。

3．p95

第三种能成为附着 ZP3 的候选分子是小鼠 p95。它之所以成为引人注目的候选者，是因为其酪氨酸被磷酸化，并且根据其 cDNA 推断的人类似物编码的是一种跨膜酪氨酸激酶。因此，小鼠 p95 和 ZP3 的结合将能激活小鼠 p95 的酪氨酸激酶活性，启动一连串信号，导致顶体反应。小鼠

p95 参与附着/发放信号的依据有:① 在获能期间,它的酪氨酸磷酸化作用水平提高,并且在顶体反应期间再次增加;② SDS－PAGE 后 95kDa 部分洗脱的小鼠精子蛋白具蛋白激酶活性,该活性能被 ZP 蛋白激活,对蛋白酪氨酸激酶抑制剂敏感;③ 采用针对电泳洗脱的小鼠精子膜蛋白 95kDa 的单抗－LL95 进行免疫化学分析和功能阻断实验,发现能使小鼠精子头部着色并抑制精－卵的结合。

三、参与配子间质膜相互作用的一些具粘附作用的分子

配子间特异性膜融合暗示有特殊的分子参与膜融合与膜间识别的调控。发育生物学家们已经开始寻找配子间的此类特殊分子。以病毒模型为基础,推测精子质膜和卵质膜上均可能有一些具粘附作用(adhesion)的分子参与的多步融合过程,如海胆精子质膜上的 bindin,鲍鱼精子质膜上的 lysin,哺乳类精子质膜上的 fertilin 和 cyritestin,卵质膜上的 integrin。

1. fertilin

fertilin 原称 PH－30,为可能参与精卵膜间相互作用最有特征性的候选分子。fertilin 为整联蛋白样蛋白,从属于 ADAM (a disintegrin and metalloprotease)或者 MDC (metalloprotease/disintegrin/cysteine－rich)分子家族。首批被报道的 ADAM/MDC 家族成员有:① EAP－1,其表达依赖于雄性激素并分布在附睾上皮细胞顶表;② MDC,一种乳腺癌肿瘤的阻遏因子;③ 豚鼠的 α－fertilin 、β－fertilin 。之后采用 PCR 等技术证实有一些 ADAM/MDC 家族成员在生精细胞中表达,其中有些为睾丸专有的;另一些 ADAM/MDC 成员分布较广。

ADAM/MDC 成员具一些保守的功能域,从氨基端起依次包括:信号肽(signal sequence)、前体区(prodomain)、金属蛋白酶区(metalloprotease domain)、整联蛋白配体区(disintegrin domain)、半胱氨酸富集区(cysteine－rich domain)、表皮生长因子样重复区(epidermal growth factor－like domain)、跨膜区(transmembrane domain)和胞内肽尾区(cytoplasmic tail)。所有 ADAM/MDC 蛋白均具有大约 80～90 氨基酸长度的整联蛋白配体区,与蛇毒金属蛋白酶(snake venom metalloprotease)的整联蛋白配体区同源(图 2.3)。

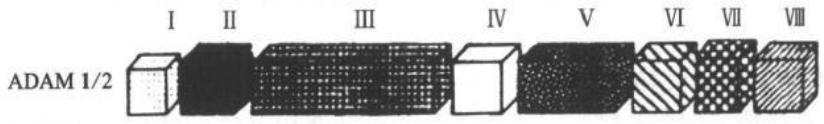


图 2.3 ADAM 结构域示意图

Ⅰ. 信号肽 Ⅱ. 前体区 Ⅲ. 金属蛋白酶区 Ⅳ. 整联蛋白配体区 Ⅴ. 半胱氨酸富集区
Ⅵ. 表皮生长因子样重复区 Ⅶ. 跨膜区 Ⅷ. 胞内肽尾区

fertilin 首次是通过筛选豚鼠精子表面单抗而分离得到的。业已发现有几种这类抗精子表面抗体可结合在参与精卵融合的精子头后部,其中一个抗体针对 PH－30,具抑制精子与无 ZP 的豚鼠卵融合,因此 PH－30 被命名为 fertilin。fertilin 是一种异源二聚体蛋白,并可形成高度有序的寡聚体。fertilin 由 α－fertilin(ADAM1)和 β－fertilin(ADAM2)两个亚单位组成,二者均为 ADAM/MDC 家族成员。业已从豚鼠、小鼠、人、牛、大鼠、兔和恒河猴等 7 种动物中克隆出 β－fertilin 同系物。

在精子发育过程中 fertilin 被蛋白酶酶解加工。β－fertilin 是在精子向附睾迁移的过程中被加工的。在成熟精子中，α－ fertilin 和 β－fertilin 均可在其金属蛋白酶区和整联蛋白配体区之间发生断裂，因此在成熟精子中的 fertilin 只有整联蛋白配体区、半胱氨酸富集区和细胞外表面上的表皮生长因子样重复区。在相当于蛇毒的整联蛋白配体区的 RGD 三肽位置上，β－fertilin 的序列为 XD/EE(X 为任意氨基酸)，该序列被认为是精卵相互作用中具活性的三肽序列。在所有 β－fertilin 同系物中，ECD 序列与随后的 XD/EE 是完全保守的。然而不能确切知道哪几个氨基酸(XD/EE 和/或 ECD)构成 β－fertilin 整联蛋白配体袢的活性位点。

β－fertilin 为细胞粘附分子。细菌表达的重组胞外小鼠 β－fertilin 以依赖二价阳离子的方式结合于小鼠卵的微绒毛区，这种二价阳离子的依赖性与小鼠精子结合的二价阳离子的依赖性相类似。小鼠卵与重组 β－fertilin 的结合可被对应于整联蛋白配体区的合成肽片段所抑制。体外受精实验证实：受精前用重组 β－fertilin 孵育小鼠卵，可以抑制精卵结合；受精前用针对整联蛋白配体区的抗体孵育小鼠精子，可以抑制精卵结合与融合；针对 β－fertilin 的抗体还可以降低兔卵的受精率；缺少整联蛋白配体区的重组小鼠 β－fertilin 不能抑制精卵结合。

β－fertilin 在受精中的作用备受关注。剔除 β－fertilin 基因后的表型呈多样性，对精子功能的影响也是多方面的，如减少精子从子宫到输卵管迁移，减少精子－ZP 结合，减少精卵结合的能力等，由此均可导致雌性不育。β－fertilin 是否参与精卵结合和融合，还是仅参与精卵结合，α－ fertilin、β－fertilin 是否也参与精子－ZP 结合，均是值得研究的问题。

目前对 α－ fertilin 了解较少，但已知 α－ fertilin 尚具有 β－fertilin 和 cyritestin 不具备的两个重要特性。首先，α－ fertilin 和 ADAM/MDC 蛋白的其他亚群在其金属蛋白酶区有一致的活性位点(HEXXHXXGXXHE)，但需酶的激活。尚不清楚 α－ fertilin 是否具有金属蛋白酶的活性。β－fertilin 和 cyritestin 不具上述这种序列。其次，某些动物的 α－ fertilin 在半胱氨酸富集区具有与病毒融合肽相类似的短序列，而 β－fertilin 和 cyritestin 不具备。病毒融合肽有一大约 20 个氨基酸的疏水序列，该序列被认为可以插入膜脂质的分子层中，便于两层膜混合并最后导致膜的融合，因此认为 α－ fertilin 可能参与膜结合与融合。

有些实验结果暗示 α－ fertilin 是在受精期间发挥细胞粘附分子的作用。以细菌表达小鼠 α－fertilin 的胞外部分，能结合于小鼠卵的微绒毛区，并抑制精卵结合。奇怪的是，缺少整联蛋白配体区大部分序列的重组 α－ fertilin (对应于豚鼠精子 α－ fertilin N 末端起始序列)同样可与卵结合，并抑制精卵结合，但作用较弱。整联蛋白配体区的截短可影响 α－ fertilin 蛋白的折叠，暗示 α－fertilin 整联蛋白配体区可能参与卵结合位点的相互作用或者维持正确的折叠。与 α－ fertilin 整联蛋白配体袢相对应的合成肽(AEDVCDLD)可轻微抑制卵结合与融合。

综上所述，β－fertilin 的整联蛋白配体区在精卵结合方面发挥作用，而 α－ fertilin 则可能有多个功能区参与精卵间相互作用。

近期鉴定的人 ADAM20 与 α－ fertilin 有几个相同的特点，如两者具有相同的金属蛋白酶活性激活位点和一个推测的融合肽，这暗示 ADAM20 可代替 α－ fertilin 的功能。小鼠的 α－ fertilin、β－fertilin、cyritestin 均可参与精卵结合，如果类似情况也存在于人的精卵结合过程中，那么人精子表面的一个功能性的 α－ fertilin 蛋白则不是精卵成功结合所必需，因为有其他精子蛋白也能参与精卵结合。

2. cyritestin

cyritestin(ADAM3,tMDCI)位于顶体反应或具穿透能力的精子顶体内膜或具完整顶体的精子赤道段。cyritestin 具备 ADAM/MDC 家族成员特征性结构域,但在它的金属蛋白酶区无活性位点序列,表明该区已被酶解失活;同时,cyritestin 在半胱氨酸富集区无融合肽序列。

cyritestin 的整联蛋白配体区参与精卵之间的反应。用对应于 cyritestin 整联蛋白配体袢的合成肽片段(12 - mer RKSKDQCDFPEF 和 8 - mer SKDQCDFP),可以有效地抑制精卵之间的反应和减少受精事件的发生;用针对 cyritestin 整联蛋白配体区的抗体处理精子,可以减少精卵结合与融合。

3. 卵质膜上 fertilin 的受体——integrin

哺乳动物卵表面的整联蛋白的亚单位有 $\alpha-2$、$\alpha-3$、$\alpha-4$、$\alpha-5$、$\alpha-6$、$\alpha-m$、$\alpha-v$、$\beta-1$、$\beta-2$ 和 $\beta-3$ 等之分。整联蛋白的抗体具阻断小鼠精卵之间相互作用的功能;$\alpha-2$、$\alpha-4$、$\alpha-5$ 抗体具抑制人精子与仓鼠卵间的相互作用。

对卵整联蛋白亚单位研究得最多的是 $\alpha-6$、$\beta-1$。它们在卵质膜上相互配对,$\beta-1$ 可与所有 α 亚单位相配对,$\alpha-6$ 只与 $\beta-1$ 相配对。通过免疫组化得知,$\alpha-6$、$\beta-1$ 存在于小鼠卵的微绒毛表面。

现普遍认为 β - fertilin 是 $\alpha-6/\beta-1$ 的配体。$\beta-1$ 整联蛋白抗体具减少重组 β - fertilin 与小鼠卵结合并抑制卵与精子结合的作用;β - fertilin 整联蛋白配体区相对应的合成肽也具减少重组 β - fertilin 与小鼠卵结合的作用。

4. 参与精卵间相互作用的其他分子

(1) DE(CRISP - 1,ARP) 一种 M_r 3.7×10^4 的精子结合糖蛋白,由附睾上皮细胞以依赖雄激素的方式合成并分泌于精子头部的表面。DE 位于大鼠精子头部的背侧,在精子成熟的过程中,DE 转移至赤道段,赋予精子与卵结合的能力。现已从大鼠、小鼠和人的精子中检测出 DE。

(2) 细胞外基质蛋白 人精子上存在几种细胞外基质蛋白,如纤连蛋白(fibronectin)、层粘连蛋白(laminin)和玻连蛋白(vitronectin)。有报道纤连蛋白与精子赤道段相结合。玻连蛋白位于具完整顶体的精子顶体部,在顶体反应后释放。层粘连蛋白位于精子尾部或顶体膜。低浓度的玻连蛋白可以增加精卵结合,而高浓度则减少精卵结合,这可能是由于在高浓度下的精子凝集作用所致,或由于玻连蛋白作为精子玻连蛋白受体和卵子玻连蛋白受体间的一种"桥梁"的缘故。尚不清楚精子上存在的层粘连蛋白是否有能力介导精卵膜间的相互作用。

(3) 补体成分及它们的受体 精子入卵似乎涉及多种与巨噬细胞吞噬作用有关的分子,如 $\alpha m\beta2$/C3b/CD46 系统。CD59,Fcγ 和 C1qR 也可能在该过程中起作用。C3 由雌性生殖道分泌,被蛋白酶(如 acrosin)酶解成为具活性的 C3b,后者能结合于精子顶体内膜上的 MCP (membrane cofactor protein ,亦称 CD46)(图 2.4)。CR3($\alpha m\beta2$)能识别 C3b 的 RGD 序列区,由此推测二聚体 C3b 可能作为一种"桥梁"通过精子的 MCP 和卵的 $\alpha m\beta2$ 使精子与卵结合在一起。

四、顶体反应的调控机制

1. 离子调控

在离子调控中 Ca^{2+} 起主导地位。在大多数哺乳动物的精子中,Ca^{2+} 主要分布于顶体区、顶体后区的顶体外膜的外表面以及精子质膜的内表面;在棕熊和黑熊中,则均匀分布于顶体赤道段前部的精子质膜、顶体的内外膜上;在豚鼠中,主要位于顶体背、腹部的两个特定区。总之,Ca^{2+} 的贮存

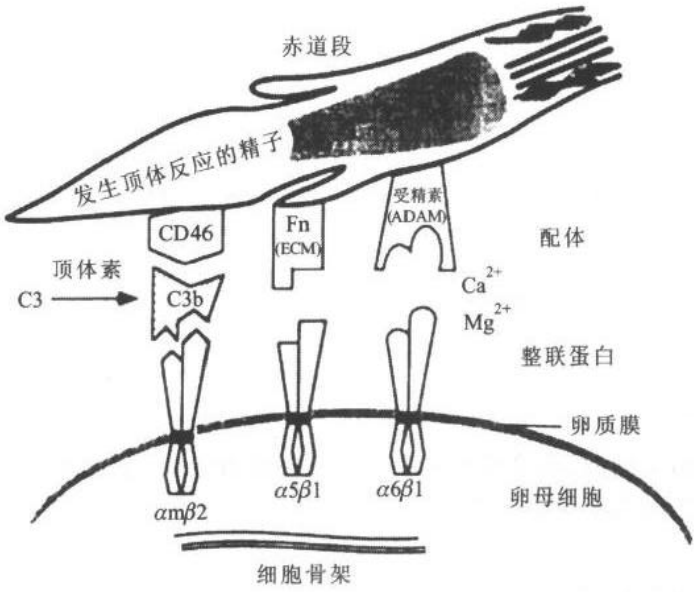


图 2.4　受精过程中精子表面配体与卵表面受体配对示意图

区是顶体反应的激烈区。现已知膜上有 Ca^{2+} 泵、Na^+/Ca^{2+} 交换器和 Ca^{2+} 通道三个 Ca^{2+} 转移系统参与调控细胞内的 Ca^{2+} 浓度。Ca^{2+} 内流是早期顶体反应的关键，这在小鼠、猪、牛、豹中已获证实。Ca^{2+} 的内流主要依赖于 Na^+/Ca^{2+} 交换的反导装置。除 Ca^{2+} 的调控之外，K^+、Mg^{2+}、Cl^-、H^+ 也对顶体反应起调控作用，如 Ca^{2+} 内流可导致 H^+ 外流，使精子内部 pH 升高，诱发顶体反应。

2. 脂质调控

脂质在精子顶体反应调控机制中起重要作用，由它调控膜的流动性和钙泵的活性。牛和豚鼠的精子在获能后，顶体的外膜和精子的质膜上的溶血卵磷脂含量下降，而卵磷脂含量升高。卵磷脂是由溶血卵磷脂酸产生的，并依赖于 Ca^{2+} 和磷脂酶 A2 作用产生溶血化合物，导致脂膜溶解，并发生胞吐作用。

3. 磷酸肌醇调控

目前认为多磷酸肌醇的产物是诱发顶体反应的第二信使。多磷酸肌醇在磷脂酶 C(PLC)的作用下，产生 4,5－磷酯酰肌醇二磷酸(PIP_2)。PIP_2 被 PLC 水解，产生二酰甘油(DAG)和 1,4,5－三磷酸肌醇(IP_3)，在 IP_3 作用下，细胞内非线粒体贮存的 Ca^{2+} 释放，使细胞内 Ca^{2+} 的水平提高，从而激活一些顶体反应所需关键酶；作为第二信使的 DAG，活化 PKC，使蛋白磷酸化，诱导顶体反应。

第四节　配子遗传物质的融合

对于海胆，精子入卵时，精子核垂直于卵表。精子入卵后，精子核解凝聚形成雄原核。在精子接触海胆卵糖蛋白凝胶时，依赖于 cAMP 蛋白激酶的活性上升，精子核就开始解凝聚。海胆精子核解凝聚是通过两种精子专一组蛋白磷酸化来实现的，以利于精子染色质周围的蛋白与卵胞质蛋白的更换，从而启动 DNA 转录与复制。雄原核形成后旋转 180°，其中心粒位于雌、雄原核之间，装

配成星体,引导雌、雄原核结合,以完成遗传物质的融合。

对于哺乳类,精子入卵母细胞后,卵母细胞质中谷胱甘肽将雄原核 DNA 周围的鱼精蛋白的二硫键还原,使精子染色质解凝聚。随着卵母细胞完成第二次减数分裂,雄原核增大,中心体装配成星体,并促使雌、雄原核朝彼此的方向迁移,在迁移中复制各自的 DNA。雌、雄原核会合后,核膜崩解,染色质浓缩成染色体,定向于有丝分裂纺锤体上,在两细胞期形成真正的二倍体核。

第五节 卵的激活

成熟的卵母细胞处于休眠状态,表现为代谢降低,蛋白和核酸的合成大幅度降低,其中 DNA 的合成完全停止。经精子刺激,成熟卵从休眠状态进入活动状态,称为卵激活(activation)。

有两种阐明精子诱导卵激活的假说(图 2.5):

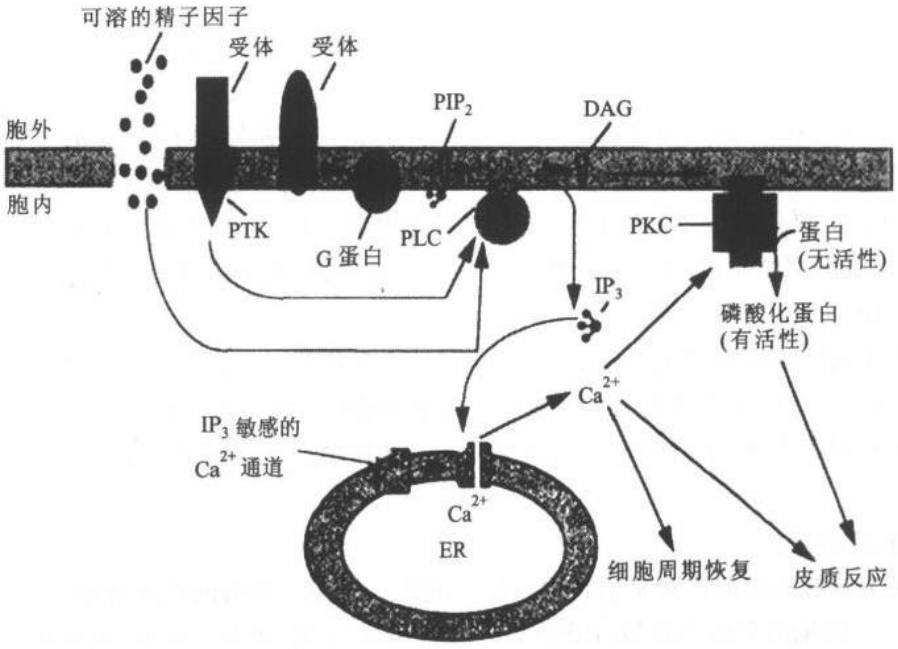


图 2.5 精子诱导卵激活机制示意图

(1) 受体假说 精子与卵表特异性受体(G 蛋白偶联的受体或酪氨酸激酶偶联的受体)结合,引发信号转导和相应的生物学效应。具体的过程为:精卵相互作用活化 PLC,作用于 PIP_2,使其水解为 IP_3和 DAG。其中 IP_3与 Ca^{2+}贮存位点结合,促使 Ca^{2+}从内质网中释放;DAG 则激活 PKC,加速 Na^+的流入和 H^+的流出,使卵内 pH 上升,从而诱导卵的激活。

(2) 融合假说 伴随精子与卵质膜的融合,一种可溶性精子因子入卵,激活卵子。显微注射精子抽提物于卵内,能引发 Ca^{2+}上升和波动、皮质反应、原核形成和分裂。精子抽提物并无种特异性。直接把活精子注射入人卵和其他动物的卵中,亦可诱发卵激活。迄今虽尚未分离出精子因子,但其活性对热和胰蛋白酶敏感,暗示可能是一种蛋白。从猪精子抽提物中发现一个 M_r 3.3×10^4

的蛋白——oscillin，可能是精子因子，但目前还没有有关 oscillin 或者其他信号蛋白可以促使卵内 Ca^{2+} 释放的报道。

迄今尚不清楚精子是通过哪条途径引发卵的激活。现就 Ca^{2+} 和 PKC 在卵激活过程中的可能作用分述于下：

(1) Ca^{2+}　许多研究证明，精子诱发 Ca^{2+} 含量的瞬间上升在卵激活介导的皮质反应和减数分裂的恢复中起重要作用。Ca^{2+} 含量的上升足够诱导卵激活事件的发生，如皮质反应、极体排出、原核形成、DNA 合成。

精子诱发卵产生 Ca^{2+} 含量瞬间上升和波动的机制尚不完全清楚。针对 IP_3 受体的特异性抗体可抑制卵激活的早晚期事件的发生，暗示 Ca^{2+} 是由对 IP_3 敏感的贮存库释放。虽然 ryanodine(一种肌浆网 Ca^{2+} 释放的抑制剂，源自 *Ryania speciosa* 的提取物)敏感的 Ca^{2+} 贮存库可能参与 Ca^{2+} 含量的调控，但由该感受器介导的 Ca^{2+} 的释放并不是精子诱导卵激活所必需。

PIP_2 在 PLC 作用下水解产生 IP_3，IP_3 作用于 Ca^{2+} 贮存库，促使 Ca^{2+} 释放。小鼠卵中含有编码 PLCβ 和 PLCγ 的 mRNA，但是只有 PLCγ 可被免疫检测到。仓鼠和小鼠卵 Ca^{2+} 含量的瞬间上升可被乙酰胆碱(Ach)、5－羟色胺(5－HT)、PLCβ 诱导，暗示 PLC 和 IP_3 可能在受精期间具引发 Ca^{2+} 含量上升的作用。

(2) PKC　PIP_2 水解的第二个产物 DAG 是 PKC 的活化剂。PKC 是信号转导途径中一个重要的酶类。现已知 PKC 有 11 个亚种，作为第二信使在不同的哺乳动物中起重要作用。在信号通道中，Ca^{2+} 含量上升和 PKC 的活化属不同系统。PKC 在哺乳动物卵激活中的作用仍有争议。近期研究证明，由佛波酯激活的 PKC 可以诱导小鼠和仓鼠皮质颗粒的胞吐作用、ZP 的修饰和阻止多精子入卵。另有研究表明大鼠细胞周期的恢复依赖于 Ca^{2+} 而不是 PKC，但皮质反应是由 PKC 诱发的。现认为人卵 PKC 的调节子(modulator)可能是 Ca^{2+} 信号效应子(effector)，而该效应子是受源自 ryanodine 敏感的 Ca^{2+} 贮存库的信号作用。

已从非洲爪蟾中分离出 PKCα、$\beta1$、$\beta2$、γ、ζ、λ，但在小鼠卵中只检测到 PKCζ、γ。采用 Western blotting 分析法，发现大鼠卵上有 8 种 PKC 同工酶：cPKCα、β、γ；nPKCδ、μ、ε；aPKCζ、λ。显然，PKC 在精子诱导卵激活中的作用仍待进一步阐明。

在卵激活过程中皮质反应似乎最为显著。皮质反应在精卵融合的瞬间发生，其生理意义在于改变卵质膜和透明带的特性，阻止多精受精，以确保胚胎正常发育。皮质反应是一个 Ca^{2+} 依赖的反应过程，其调控机制类似于精子的顶体反应。

综观以上所述，不难看出受精实为雌雄配子间系列有序、相互协调且复杂的作用过程。受精过程中涉及各方分子水平上变化的研究报道不少，但多数只是探索性的。随着研究的深入，以及受精过程众多作用环节机制的阐明，无疑将会对动物繁殖、人类生殖健康等领域带来无限福音。

参考文献

1　陈大元. 受精生物学. 北京：科学出版社，2000. 199～215

2　Carroll J. The initiation and regulation of Ca^{2+} signalling at fertilization in mammals. Semin Cell Dev Biol, 2001, 12 (1): 37～43

3 Jansen S, Ekhlasi-Hundrieser M, Topfer-Petersen E. Sperm adhesion molecules: structure and function. Cells Tissues Organs. 2001, 168(1~2): 82~92

4 Oehninger S. Molecular basis of human sperm-zona pellucida interaction. Cells Tissues Organs, 2001, 168(1~2): 58~64

5 Wassarman P M, Litscher E S. Towards the molecular basis of sperm and egg interaction during mammalian fertilization. Cells Tissues Organs, 2001, 168(1~2): 36~45

6 Tarone G, Hirsch E, Brancaccio M, *et al*. Integrin function and regulation in development. Int J Dev Biol, 2000, 44: 725~731

7 Rosati F, Capone A, Giovampaola C D, *et al*. Sperm-egg interaction at fertilization: glycans as recognition signals. Int J Dev Biol, 2000, 44: 609~618

8 Finaz C, Hammami-Hamza S. Adhesion proteins expressed on human gamete surfaces and egg activation. Biol Cell, 2000, 92(3~4): 235~244

9 Topfer-Petersen E, Petrounkina A M, Ekhlasi-Hundrieser M. Oocyte-sperm interactions. Anim Reprod Sci, 2000, 60~61: 653~662

10 Yamano S, Nakagawa K, Nakasaka H, *et al*. Fertilization failure and oocyte activation. J Med Invest, 2000, 47(1~2): 1~8

11 Primakoff P, Myles D G. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. Trends Genet, 2000, 16(2): 83~87

第三章　卵　　裂

受精的过程虽然十分神奇，但它仅仅是个体发育的第一步（不少实验胚胎学家认为个体发育的起点应是卵）。受精卵在获得了新的遗传物质和进行了细胞质的重排之后，便开始多细胞体的形成过程。在所有已知的动物中，这一过程始于卵裂，通过多次的有丝分裂将大量的卵质分配到无数个较小的、具核的细胞中去。卵裂阶段的细胞被称之为卵裂球。

在大多数种类的动物中，受精后早胚细胞分裂的速度以及各卵裂球所处的位置都是由贮存在卵内的母型 mRNAs 和蛋白质所控制的。通过有丝分裂分配到卵裂球中的合子基因组，在早期卵裂胚胎中并不起作用，即使用化学物质抑制转录，早胚也能正常发育。直到卵裂较晚的时期，早胚才大量转录合成 mRNAs，实现由母型向合子型过渡的调控胚胎发育的机制。大多数物种在卵裂时，胚胎的体积并不增大。这与其他细胞增殖时有区别，其他细胞通常在两次有丝分裂之间有一个生长期，使分裂后的子细胞保持原有体积，这种生长的过程使细胞的核质比例维持恒定。然而早胚卵裂时，细胞体积不增加，而是将受精卵的大量卵质分配到数目不断增加的较小的细胞中。受精卵是以二分裂、四分裂和八分裂的方式进行，两次分裂之间无生长期，而核的分裂却以一种前所未有的速度（甚至在肿瘤细胞中也不存在的速率）进行。例如，一个蛙受精卵在 43 h 内可分裂成 37 000 个细胞；而处于卵裂阶段的果蝇，每 10 *min* 完成一次有丝分裂，这种状况可持续 2 个多小时。卵裂期细胞数目的增加速度与其他发育阶段相比要快得多，这种迅速分裂的结果导致核与细胞质的比值迅速减小。在多种生物的胚胎中，核质比值的成倍减小是决定某些基因定时开始转录的因素。在非洲爪蟾胚胎中，直到第 12 次卵裂后才开始转录 mRNA，届时卵裂的速度减慢，卵裂球开始运动，合子基因组开始转录。由于这种转化（合子型基因的打开）的时间能通过改变每个细胞核中染色质的量而改变，因而认为新合成的染色质能感受卵内一些因子的量的变化。胚胎细胞中染色质含量愈高，这种转化发生愈早。如果核内染色质是正常情况的 2 倍，这种转化将提前一个周期发生。因此于受精后开始的受母型调控的卵裂，将于核质比例达到一个新平衡点而终止。

第一节　胚胎的卵裂方式

早期卵裂（cleavage）是在母型调控下进行的极其协调的过程。每个物种的卵裂方式是由两个因素决定的：① 卵质中卵黄的含量及其分布情况，② 卵质中影响纺锤体方位角度和形成时间的一些因子。卵黄的量和分布决定卵裂发生的位置和卵裂球的大小。卵裂的速度在卵黄含量低的一极快于卵黄含量高的一极。卵黄含量丰富的一极称为植物极，而卵黄含量相对较少的另一极称为动物极。受精卵的核往往向动物极移动。表 3.1 为卵裂方式的分类，显示卵黄对卵裂的对称性和卵裂方式的影响。通常情况下，卵黄对卵裂具一定的阻抑作用，含卵黄相对少的受精卵（均黄卵和中黄卵）的卵裂为均裂，卵裂沟通过整个卵。卵黄含量高的受精卵采用偏裂的方式，只有部分卵质分

裂，分裂沟不陷入卵黄部分。偏裂又可分为盘状裂（如鸟卵）和表面裂（如昆虫卵），选择哪一种分裂，取决于卵黄是分布于受精卵的一端（端卵黄）还是分布于受精卵的中央（中央卵黄）等。

表 3.1 卵裂方式的分类

卵裂方式	卵黄位置	卵裂的对称性	代表性动物
完全卵裂	稀疏和均匀	辐射状对称	棘皮动物、文昌鱼
	分布的卵黄	螺旋状对称	大多数的软体动物、环节动物、扁虫及线虫
	中度卵黄	两侧对称	海鞘
		交替旋转对称	哺乳动物
		辐射状对称	两栖类
不完全卵裂	端卵黄	两侧对称	头足纲、扁虫
		圆盘形	爬行类、鱼类、鸟类
	中央卵黄	表面的	大多数节肢动物

卵黄是使胚胎在没有外源食物的情况下得以发育的进化上的一种适应性选择。没有大量卵黄的卵，如海胆卵等，通常采用迅速形成能自我生存的幼虫的阶段，然后再继续发育。哺乳动物的卵也缺乏卵黄，于是采用生成胎盘的形式来获取所需的物质，胚胎的一部分细胞形成胎盘，为胚胎发育提供食物和氧气。

另一个极端是昆虫、鱼类、爬行类和鸟类的卵，卵的大部分由卵黄占据。由于在这些动物的发育过程中既没有幼虫阶段，也不存在胎盘结构，因此卵黄是胚胎发育所必需的。在一些蛙类中，也可见大量卵黄与缺乏幼虫阶段的相关性。某些热带蛙，如卵齿蟾属（*Eleucherodactylus*）和小节蛙属（*Arthrotepcella*），没有蝌蚪阶段，它们的卵中卵黄含量极高。由于没有蝌蚪阶段，所以它们的卵没有必要产在水中。

然而，卵黄只是影响物种卵裂方式的因素之一，一些遗传下来的卵裂方式可能与卵黄的分裂抑制影响相叠加，这可以在只有少量卵黄的均黄卵中观察到。在卵黄较少的情况下，可发现有 4 种主要的卵裂形式：辐射状卵裂，螺旋状均裂，双边均裂和旋转型均裂。

现就两栖类、哺乳动物、斑马鱼和果蝇的卵裂分述如下。

一、两栖类

大多数蛙和蝾螈胚胎是放射对称均裂的，与棘皮动物卵裂类似。但是两栖类卵中的卵黄含量较高，主要集中于植物极，成为卵裂的障碍。因此，第一次卵裂开始于动物极并慢慢延伸入植物极（图 3.1）。在美西钝口螈螈，动物半球卵裂沟的延伸速度为 1 mm/min，当卵裂沟分隔灰色月牙区后，在植物极延伸的速度仅为 0.02～0.03 mm/min。

在蛙受精卵，当第一个卵裂沟正试图分裂植物极具卵黄的卵质时，第二个卵裂沟已于动物极开始形成。第二次卵裂与第一次卵裂成直角而且都是经线裂。第三次是纬线裂，但由于植物极富含卵黄，因此卵裂沟紧靠动物极一端。这样在动物极形成 4 个小的卵裂球，而于植物极则形成了 4 个大的卵裂球。这种不均等的分裂使胚胎形成两个不同的区域，一个是靠近动物极的迅速分裂的小卵裂球区域，另一个是靠近植物极分裂较慢的大卵裂球区域。随着不断的分裂，在动物极区域堆积了无数小的细胞，而植物极区域则由数量相对较少、体积大、富含卵黄的大卵裂球形成。

在两栖类，由 16 至 64 细胞构建的胚胎常被称为桑椹胚。在 128－细胞阶段，囊胚腔形成，因

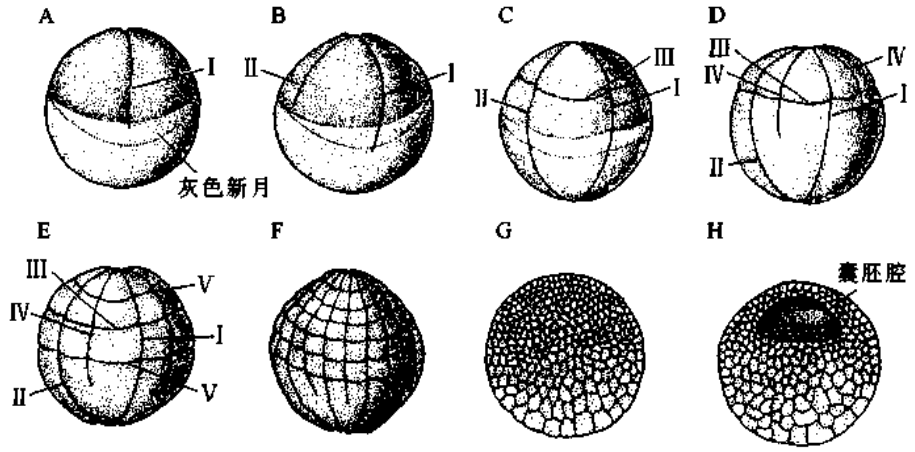


图 3.1　蛙卵的卵裂(罗马数字标明出现的次序)

A、B. 植物极卵黄阻碍卵裂,以至于在第一次卵裂完成之前,第二次卵裂已于动物半球开始　C. 第三次卵裂靠近动物极。与动物半球相比,植物半球细胞数少,并呈长形　D－H. 同动物半球相比,植物半球的卵裂球数量较少但体积较大

而被称之为囊胚。事实上,囊胚腔的形成可以追溯到第一次卵裂。在非洲爪蟾,第一次卵裂的近动物极卵裂沟较宽,形成一个小的细胞间的腔,该腔通过细胞间的紧密连接而与外界隔离。在以后的分裂过程中,该腔不断扩大而形成囊胚腔。

对于蛙胚胎而言,囊胚腔具备两种功能:① 在原肠形成过程中,囊胚腔利于细胞迁移,并防止上下层细胞间不成熟地过早接触。如从囊胚腔顶部取出胚胎细胞置于囊胚腔底部富含卵黄的植物极细胞旁边时,该动物极细胞发育形成中胚层而不是外胚层。由于中胚层细胞组织通常是由内胚层前体相邻的动物极细胞形成的,因此存在着植物极细胞影响动物极细胞分化成中胚层组织的可能性。显然,囊胚腔对将发育成皮肤和神经组织的细胞的完整性具有重要的维护作用。

囊胚细胞在分裂时,大量细胞黏着分子与之结合在一起,其中有 EP－cadherin,这种蛋白的 mRNA 源自卵母细胞,若将这种 mRNA 的反义寡核苷酸注入受精卵中,致使 EP－cadherin 无法形成,囊胚期细胞间的粘着会显著降低,囊胚腔缺失。

二、哺乳动物

哺乳动物的卵裂是最难研究的,这点并不奇怪。在动物王国中,哺乳动物的卵最小,难以操作。人类的受精卵,直径仅 100 μm,肉眼几乎看不见,是非洲爪蟾卵体积的千分之一。哺乳动物受精卵的数目也无法与海胆和蛙的相比。通常一个雌体每次排卵少于 10 个,所以无法得到足够的材料用于生化研究。哺乳动物的胚胎发育是在一个器官内完成,而不是在体外完成的。只是在最近模拟体内条件,才能于体外观察到受精卵的发育情况。虽然存在这些困难,但是由于哺乳动物的卵裂与其他动物的卵裂方式有明显的差异,因此有关哺乳动物卵裂的机制还是值得探索的。

哺乳动物的卵由卵巢释放,然后进入输卵管。受精发生在输卵管靠近卵巢一端的壶腹部,减数分裂于受精后完成。第一次卵裂在受精一天后发生。哺乳动物的卵裂是最缓慢的卵裂,12 至 24 h 完成一次。卵裂的胚胎借助于输卵管纤毛运动朝子宫方向迁移,早先几次的卵裂是在输卵管内进行的。

与其他类型的卵裂相比，哺乳动物的卵裂有几个特征：① 卵裂速度缓慢。② 卵裂球间排列方式很独特。第一次卵裂是正常的经线裂，第二次卵裂时，其中一个卵裂球是经线裂，而另一个则是纬线裂。这种类型的卵裂被称之为旋转均裂。③ 早期卵裂不同步。不是所有的卵裂球都同时进行卵裂，因此哺乳动物胚胎的细胞数不是成倍增加，而通常是由奇数个细胞组成。此外，与大多数其他动物不同，哺乳动物在早期的卵裂过程中，合子基因组就已开始活动，合成卵裂所必需的蛋白质。在小鼠和山羊，由母型调控向合子型调控的过渡发生于 2－细胞阶段。

1. 紧密化

也许哺乳动物与其他类型卵裂之间最关键的区别是其存在紧密化现象。从图 3－2 可见，在 8－细胞阶段前的卵裂球之间有足够空间呈松散型排列。在第三次卵裂后，卵裂球的行为发生了让人惊异的改变。它们突然挤在一起，卵裂球之间的接触面增大，形成一个紧密的细胞球体（图 3.2C、D 和图 3.3）。这种紧密堆积的排列是通过球体外层细胞之间形成紧密的连接而维持的，这种连接把球的内部封闭起来。在这些相互形成紧密连接的细胞之间，小分子和离子能相互往来。

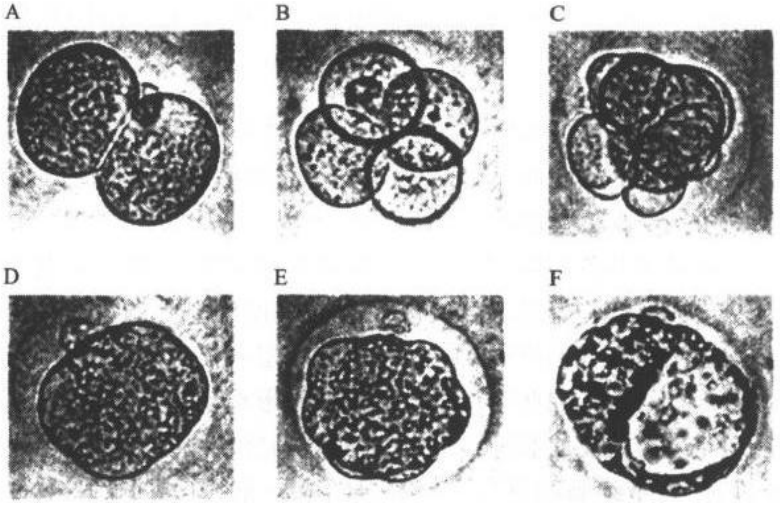


图 3.2 体外小鼠早胚的卵裂

A. 2－细胞阶段 B. 4－细胞阶段 C. 8－细胞阶段早期 D. 紧密化的 8－细胞阶段 E. 桑椹胚 F. 囊胚

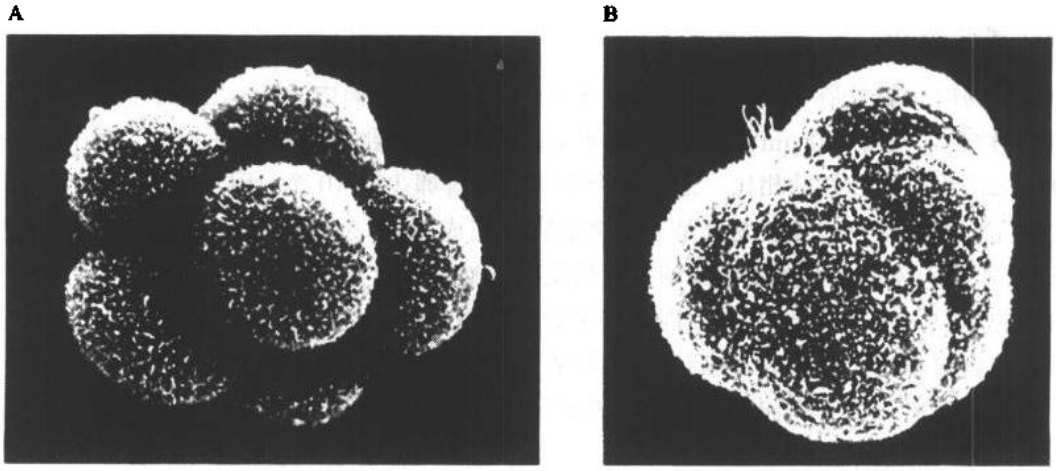


图 3.3 紧密化前(A)和紧密化后(B)的小鼠 8－细胞期胚胎的扫描电镜图

紧密化的细胞分裂后，形成16个细胞的桑椹胚。在桑椹胚中有1~2个细胞属内细胞团，并由大多数的外层细胞所包围。由大多数的外层细胞分裂产生的子细胞成为滋养层细胞，这群细胞不参与胚胎结构的形成，而参与形成绒毛膜组织，是胎盘中的胚胎组分。这种结构能使胎儿从母体获得氧气和营养；还可分泌激素使胎盘能维持胚胎的生长；产生免疫调控因子，使胚胎免遭母体排斥。尽管滋养层细胞不参与胚胎的组成，为胚外组分，但却是胚胎植入子宫所必需的。

小鼠胚胎的组分主要来源于桑椹胚(16－细胞期)的内细胞团，胚外组分则来自于分裂到32细胞时的滋养层细胞。内细胞团将发育成为胚胎，与卵黄囊、尿囊和羊膜相连。内细胞团的细胞不仅形态上与滋养层细胞不同，而且在早期发育阶段还合成不同的蛋白质。在64－细胞阶段，内细胞团(约13个细胞)与滋养层细胞已分层，相互之间不再有细胞交换。因此滋养层细胞与内细胞团卵裂球的分离代表了哺乳动物发育中的第一个分化事件。最初的桑椹胚内部是没有空腔的。后来在成腔作用(cavitation)过程中，滋养层细胞向桑椹胚中分泌液体产生囊胚腔，内细胞团则位于滋养层细胞环的一侧(图3.2F)，这种结构叫囊胚，是哺乳动物卵裂的另一个标志。

2. 细胞表面和紧密化的机制

紧密化(compaction)为哺乳动物发育中第一次分化(滋养层与内细胞团的分离)的外部条件。有证据表明，相邻细胞间的表面间作用是导致细胞紧密化的原因。在紧密化之前，8－细胞阶段卵裂球的膜发生广泛的极化作用，细胞表面的不同组分迁往细胞的不同区域。借助于荧光素标记的一类植物凝集素显示，在4－细胞阶段有一些糖蛋白分子在细胞膜表面是随机分布的；到了8－细胞期，这些分子主要集中于远离中心的几个极上。这种结果显然是由于细胞与细胞间相互作用而产生的。倘若将卵裂球单独分开，就不会出现这种现象，但在成对分开时这种现象就会出现。

有些专一的细胞表面分子在紧密化作用中扮演着重要角色，其中之一为 M_r 1.2×10^5 的糖蛋白——E－cadherin(又称uromorulin)。这种糖蛋白在2－细胞期合成，并均一地分布于细胞膜上。随着紧密化的发生，E－cadherin主要集中于卵裂球相互接触的接触面上。抗E－cadherin的抗体能使桑椹胚细胞散开，并能抑制畸胎瘤细胞间相互粘着。该糖蛋白中的糖链部分是发挥功能所必须的，用该蛋白糖基化的抑制物同样能抑制紧密化的起始。如果把4－细胞期胚胎置于含蛋白激酶C的培液中，将发生提前的但不成熟的紧密化作用。同样，二乙酰甘油也能引起4－细胞期胚胎发生紧密化作用。当紧密化作用发生时，E－cadherin特异地聚集在卵裂球间的接触部分。这些结果显示，激活蛋白激酶C能改变E－cadherin的分布，并由此启动紧密化作用。

在紧密化过程中，通过细胞骨架的重组也能修饰改变细胞膜。由肌动蛋白微丝延伸形成的微绒毛出现于相邻细胞的表面，并在细胞间相连。这些微绒毛可能是E－cadherin介导细胞间粘着的位点。因此卵裂球间的接触可能是通过肌动蛋白的解聚，使微绒毛缩短，把卵裂球更紧密地拉在一起。不断有证据表明紧密化作用与卵裂球细胞的结构变化有关。

3. 内细胞团的形成

内细胞团(inner－cell mass)的产生是哺乳动物早期发育的关键步骤之一。细胞是怎样进入这条或者那条发育途径的呢？一个细胞是受怎样的指令，使其或者成为成年个体的一部分，或成为一个支持胚胎发育、并于出生时被抛弃的胚外组织呢？通过对活胚胎的观察研究，发现这种重要决定的作出仅仅依赖于细胞于某一正确时间出现在某一正确的位置。直到8－细胞阶段，卵裂球之间的形态、生化和潜在能力等方面的特征都还没有差异。之后才通过紧密化作用形成内部和外部特性具重大差异的细胞。许多研究者通过标记不同的卵裂球等方法证实，紧密化作用后位于外层的

细胞将形成滋养层细胞，而内部的细胞将发育成胚胎。将 4 细胞期小鼠胚胎的每个卵裂球置于一群聚集的卵裂球的四周，所有外周的移植细胞只能形成滋养层细胞。因此，一个细胞是否成为胚胎或滋养层细胞，完全取决于紧密化作用后细胞所处的位置是位于外周还是内部。

4. 囊胚脱离透明带

在输卵管内迁向子宫途中，囊胚不断膨胀。滋养外胚层细胞膜上的钠/钾泵向囊胚腔中转运离子；与离子积累相伴随的是，由于渗透压的作用，水分进入囊胚腔，从而使囊胚腔扩大。在这个阶段，为了防止胚胎与输卵管管壁的粘着，透明带是必需的。在人类，这种粘着作用确实会发生，进而导致异位妊娠，胚胎在输卵管中着床，这将会导致相当危险的出血。胚胎进入子宫后，必须"孵化"出"壳"，这样才能粘着于子宫壁。通过在透明带上溶出的小洞，加上囊胚的膨胀压力，小鼠囊胚从透明带中挤出来。位于细胞膜上的胰蛋白酶样的蛋白酶 strypsin，具有把透明带的纤维基质消化出一个洞的作用。一旦"孵化"出"壳"，囊胚直接与子宫接触。借助于胞外基质中的胶原蛋白、透明膜糖蛋白、黏着蛋白、透明质酸和硫酸已酰肝素受体，子宫上皮将囊胚"捕获"。滋养层细胞膜上含有的整合蛋白与子宫上的胶原蛋白、黏着蛋白和透明膜糖蛋白结合。在囊胚植入时，滋养层细胞大量合成硫酸已酰肝素蛋白聚酶。一旦囊胚植入子宫上皮组织，囊胚会释放出另一些蛋白酶，如胶原酶、stromelysin、血纤维蛋白溶原酶活化因子等。这些蛋白酶能消化子宫内膜组织的细胞外基质，以便于囊胚埋入子宫壁。

5. 双胞胎和胚胎干细胞(embryonic stem cell)

早期胚胎的细胞之间可以相互置换和补偿，这种现象早已被证实。去掉 2－细胞期兔胚的一个细胞，留下的另一个细胞仍可以发育成完整的胚胎。内细胞团一旦与滋养层分离，即成为一种"等价群体"(equivalence group)，其中的每一个细胞具有相同的潜能。在这种情况下，每个细胞都能发育成胚胎中所有类型的细胞，但不能成为滋养层细胞。它们各自的命运将由它们子代细胞的相互作用来决定。若将内细胞团的细胞转移注入到另一囊胚腔中，它们将参与发育成新的胚胎，而滋养细胞则不能。由于它们可发育成身体中任何类型的细胞，所以，内细胞团有时也被看作为"多能母细胞"(pluriblast)。

人类的双胞胎被分为两类：同卵双生和异卵双生。异卵双生是两个卵分别受精的结果。同卵双生则源于同一胚胎，胚胎中的细胞由于不明原因相互分离导致产生双胞胎。因此，同卵双生可以通过早胚卵裂球的分离，甚至是同一囊胚中内细胞团一分为二而产生。

同卵双生占人类出生比率的 0.25%。33% 同卵双生的胎儿各具独立的绒毛膜，表明这种分离发生于囊胚组织形成(5 天)前(图 3.4A)。其余的同卵双生共用一个绒毛膜，说明分离发生在囊胚形成之后的内细胞团中。到第 9 天，人类胚胎已完成了另一个胚外结构——羊膜，包围在胚胎的四周，腔内充满羊水，能防止胚胎因干燥和剧烈运动而导致的胚胎损伤。如果双胎的分离介于绒毛膜形成的第 5 天和羊膜形成的第 9 天之间，那么会导致双胎共用一绒毛膜和各具一羊膜(图 3.4B)。有三分之二的同卵双生是这种情况。只有极少的同卵双生是位于同一绒毛膜和羊膜内的(图 3.4C)，这种情况意味着胚胎的分离发生于 9 天之后，这种新生儿存在连体胎儿的风险。

人为地将源自不同小鼠胚胎(2－细胞期或多细胞期，通常在 4 或 8－细胞期)的细胞组合在一起，所形成的组合胚胎可产生出嵌合体小鼠(图 3.5)。将遗传性状不同的两种小鼠胚胎透明带去除，并将它们结合成一个囊胚，移植到假孕的母鼠子宫内继续发育。出生后的嵌合体子代中含有源自两种胚胎的细胞。如果组合的卵裂球分别来自具不同毛色的品种，结果是显而易见的。将白鼠

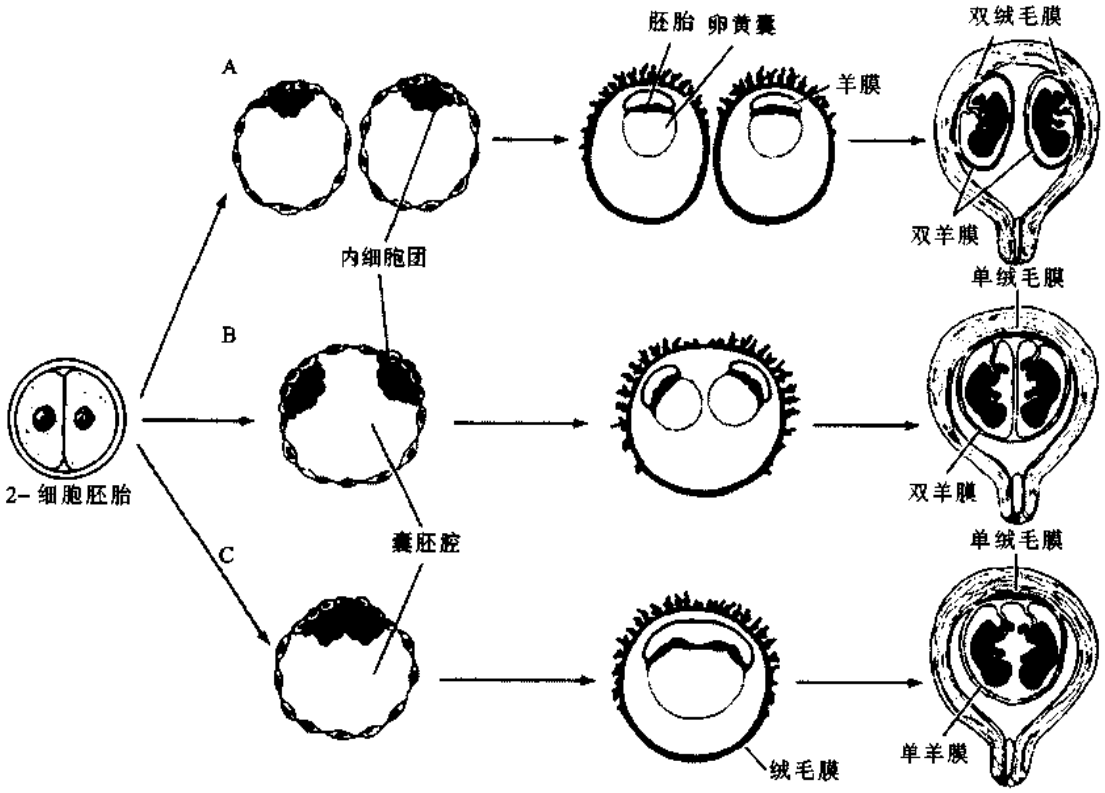


图 3.4　人类同卵双胞胎的形成与胚胎外膜相关的时序示意图

A. 分离发生于滋养层形成之前，因此两个胚胎有各自的羊膜和绒毛膜　B. 分离发生在滋养层形成之后和羊膜形成之前，导致两个胚胎共用一个绒毛膜，但有各自的羊膜腔　C. 分离发生在羊膜形成之后，导致两个胚胎处于同一羊膜腔内，并共用绒毛膜

和黑鼠进行组合，通常可得到黑白相间的嵌合鼠。有证据表明，人类胚胎也能形成嵌合体，这些嵌合体中存在两类不同遗传性状(XX 和 XY)的细胞，每一类都具备其自身的遗传学特征。对这种现象最简单的解释是，这种嵌合体是由两个胚胎聚集而产生的，其中一个为雄性胚胎，另一为雌性胚胎。如果这种解释是正确的，那么这种嵌合体就是异卵双生的两个胚胎融合形成的单一混合个体。

有研究显示，三个 8-细胞期小鼠胚胎可结合在一起，形成一个正常的紧密化桑椹胚，这种胚胎所形成的个体具有来自三种不同小鼠的毛色，而且三种胚胎都可产生各自的配子前体。当一个嵌合的(黑/棕/白)雌鼠同一个白毛(隐性的)雄鼠交配后，其子代中三种毛色的仔鼠都有。

在研究双胞胎和嵌合小鼠时发现，内细胞团中的每个分裂球均能产生身体中任何细胞类型这一理论是正确的。当内细胞团细胞被分离，并在一定条件下生长时，它们会在培养过程中保持未分化的特征，并可持续不断地分裂。这些细胞被称为胚胎干细胞。在培养过程中可改造这些细胞，例如，可将克隆的外源基因插入到它们的核内，或直接改造其基因等。当将胚胎干细胞注入到另一小鼠胚胎的囊胚中时，胚胎干细胞可结合到宿主的内细胞团中，长出的胚胎中含有源自移植体的组织。该种技术已经成为一种非常重要的、用于研究哺乳动物发育过程中基因功能的手段。

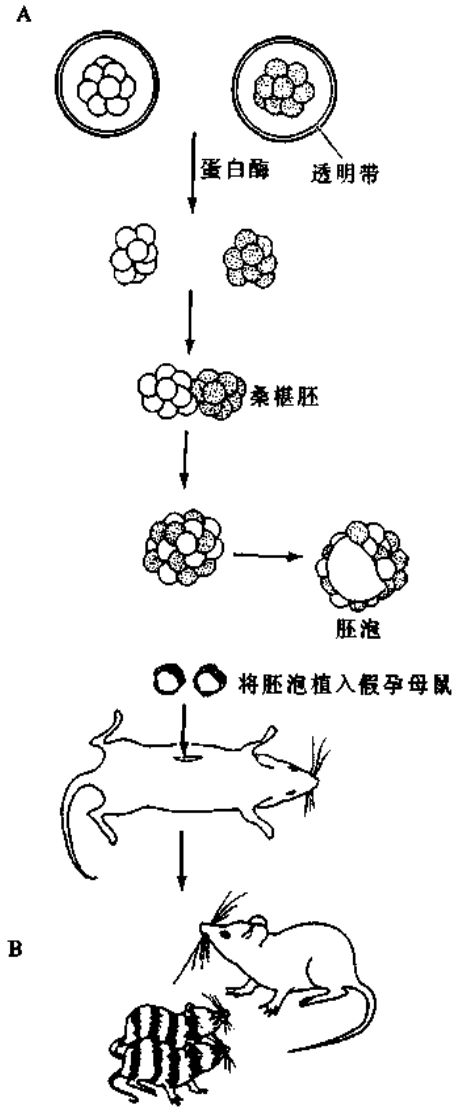


图 3.5　非自主表型小鼠的构建

A. 构建非自主表型小鼠的实验程序。遗传上差异明显的两个 8－细胞胚胎分别从小鼠输卵管中分离，去透明带后，将两个胚胎融合成一个混合的胚胎，着床到假孕母体的子宫内　　B. 成年的非自主表型的小鼠显示出分别来自于两个胚胎的特征

三、斑马鱼

近几年来，斑马鱼(zebrafish)已成为研究脊椎动物发育的很好的实验材料。这种鱼产卵次数多，可全年繁殖，胚胎透明，体外发育，有利于进行观察。斑马鱼很容易人工饲养，其突变体易被筛选和增殖。另外，它们发育很快，受精后 24 h，胚胎就具备大部分的组织和器官原基，并显现出蝌蚪状特征。

鱼类的多卵黄卵的发育同鸟类相似，细胞分裂仅仅在动物极胚盘中发生。在扫描电镜下可观察到鱼卵漂亮的盘状不完全卵裂(图 3.6)。同两栖类和海胆的胚胎一样，早期卵裂伴随着高度重

复的经裂—纬裂模式，这种分裂很迅速，约 15 min 一个周期，最初的几次分裂同步发生，形成一堆屹立在卵细胞动物极的细胞。开始时，所有的细胞间以及细胞和下层的卵黄细胞间保持着开放式的联系，中等大小的分子(M_r 1.7×10^4)可自由地从一个分裂球到另一个分裂球中去。约从第 10 次分裂开始，中囊胚进入由母型调控向合子型调控的过渡期：合子基因开始转录，细胞分裂减慢，细胞移动明显等。

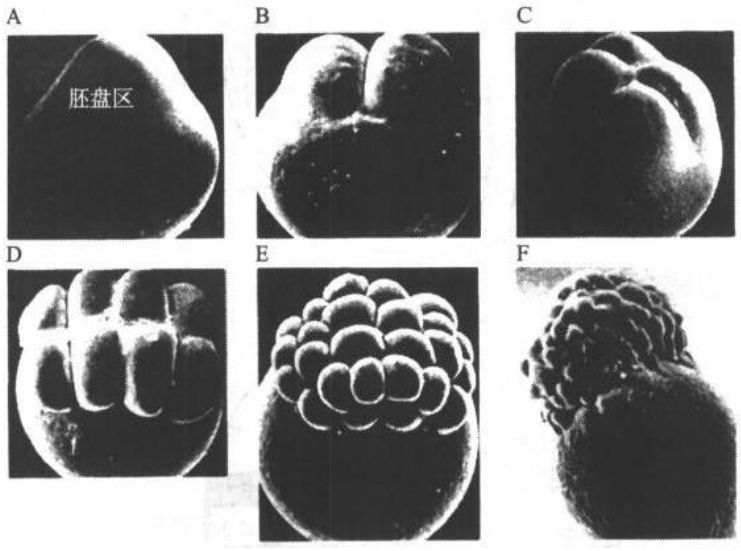


图 3.6　斑马鱼的盘状卵裂过程

这时，可逐步辨别出三个细胞群：① 卵黄合胞体层。在第 9 或第 10 次细胞分裂周期，位于植物极边缘的胚层细胞与其下层的卵黄细胞融合，融合后的胚层细胞核在紧挨的卵黄细胞质中排列形成核环。当胚层向植物极延伸并扩展到卵黄细胞周围，有些卵黄合胞体核将在胚层下迁移，形成内部卵黄合胞体层；而另一些核将向植物极移动，停留在胚层边缘的前头，形成外部卵黄合胞体层(图 3.7A)。目前尚不知道卵黄合胞体层具哪些功能。② 包被层，位于胚层的最外层，是由单层细胞组成的表层(图 3.7A)。包被层最终形成表皮，为一种胚外保护层，随着后期胚胎的发育，该层将被抛弃。③ 深层细胞，位于外层的包被层和内层的卵黄合胞体层之间，是胚胎的主体。早期胚层的命运不确定。将不扩散的荧光染料注入到早期胚层细胞中，追踪研究细胞谱系发现，卵裂过程中细胞是混合的，而且每个细胞都可发展成后代组织中不可预见的细胞类型。直到原肠形成前胚层的命运才被确定下来。这时，位于胚胎特定区域的细胞按高度可预见性的方式发展成一定的组织。其命运图见图 3.7B。

对给定的任何组织来说，细胞发展成组织的过程，包含了一种发育命运的窄化现象。从斑马鱼心脏前体细胞的发生可看出一些最早的细胞命运决定的过程(图 3.8)。卵裂中期位于预计的背面和腹面间中部的一个边缘细胞能发展成心内膜和心肌；稍后，任何一个细胞的后代将只能产生心内膜或心肌膜中的一种；再往后，一个细胞的后代则只能分布在组织中特异的亚区室，例如，中囊胚细胞只能分布在心脏的心房或心室。

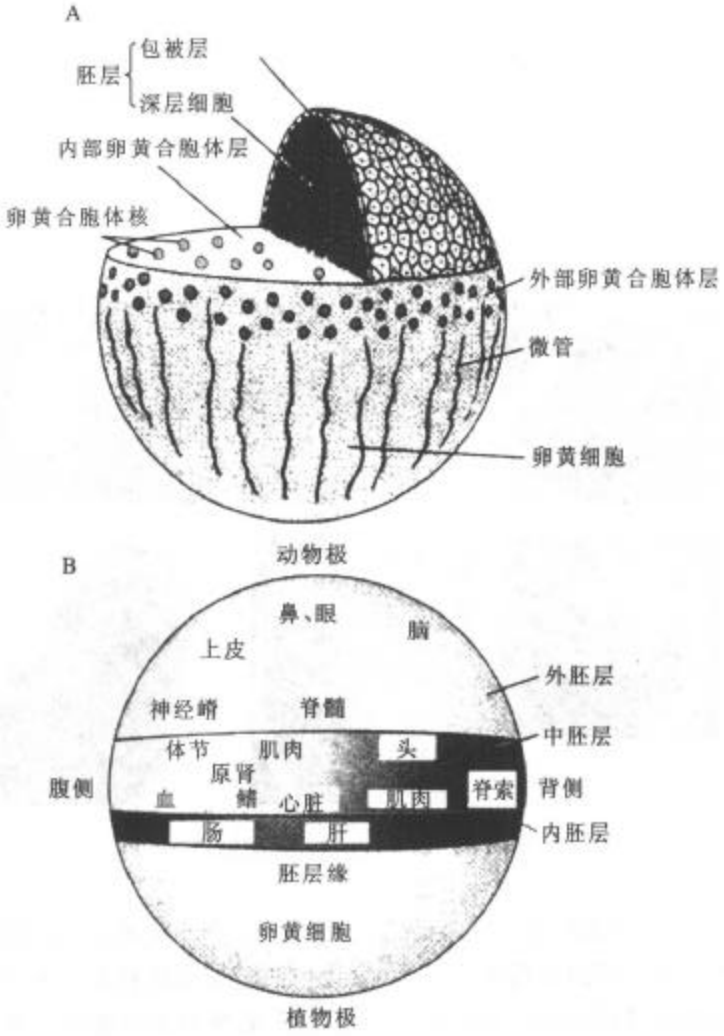


图 3.7　斑马鱼囊胚

A. 原肠形成以前，深层细胞被包被层包围。卵黄细胞的动物极表面平坦，含有卵黄合胞体层细胞的核。微管穿行于卵黄化的胞质和卵黄合胞体层的外部区域　　B. 细胞混合后，深层细胞的命运图

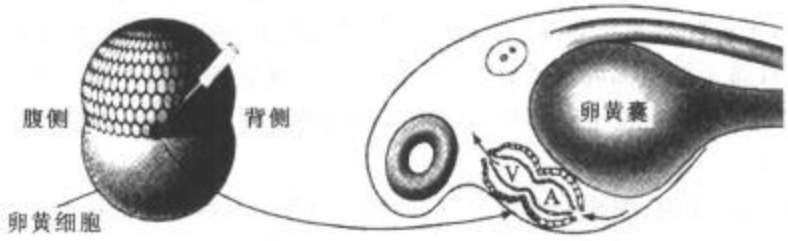


图 3.8　斑马鱼囊胚中下层细胞的命运图

于早囊胚期(256～512－细胞期)的细胞中注入玫瑰红葡聚糖进行标记，如果该细胞源自接近背、腹极间的中部边缘，那么它的后代分布在心脏的心房和心室，而在晚囊胚期标记该处细胞，那么它的后代将只能分布在心房或心室

V. 心室　　A. 心房

四、果蝇

昆虫受精卵行表面卵裂。由于大量卵黄位于卵的中央，因此卵裂被限制在卵的外围卵质中。这种卵裂的一个有趣特征是，直到核已分裂，细胞还不形成。图 3.9 显示果蝇受精卵的卵裂情况。合子型的核于卵的中央部分进行多次的有丝分裂，平均每 8 min 一次核分裂，形成多达 256 个细胞核。然后细胞核迁移至卵的四周，此时，核的有丝分裂仍不断进行，但速度有所减慢。这时的胚胎称为合胞体胚层(syncytial blastoderm)，意指所有的核都位于同一细胞质中。该合胞体除了保留受精卵的细胞膜外，没有别的细胞膜存在。那些迁移到受精卵后极的核迅速由新形成的膜所包围，形成极细胞，将来发育为成年个体的生殖细胞。因此昆虫卵发育的最早事件之一是把未来的生殖细胞与胚胎的其余部分区分开。

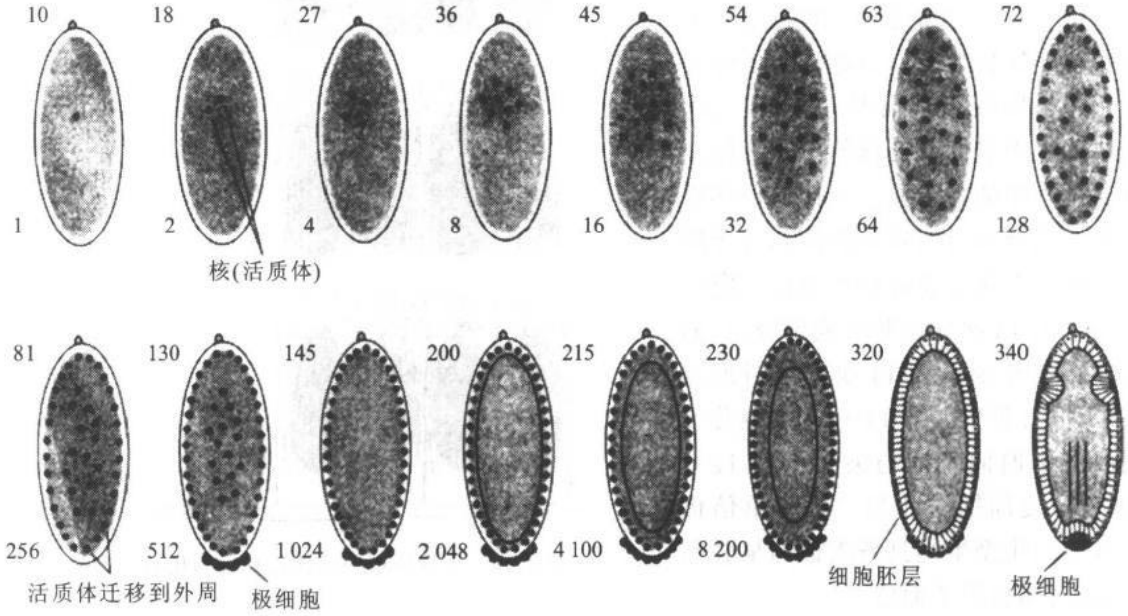


图 3.9　果蝇胚胎的表面卵裂

每个胚胎上方的数字是排卵后的时间(min)，下方的数字是指已出现核的数目，即使在推迟近 3 h 还没有形成细胞胚层的情况下，极细胞(未来的生殖细胞)还是在 512 个核阶段出现。由于每次细胞分裂所需的时间部分地依赖于卵孵育的温度，因此时间不是很确定的

极细胞形成之后，卵膜内陷于核之间，最终把每个核分隔成单一的细胞(图 3.10)。这样就形成了细胞胚层，所有的细胞都沿着卵黄核心单层排列。同其他细胞形成一样，细胞胚层的形成包括一个精致的微管和微丝之间的相互作用。胚层的第一期细胞化特征是细胞膜内陷以及位于核间区域的内在肌动蛋白网，这个过程可被微管形成的阻断剂所抑制。细胞膜和肌动蛋白向深部延伸包绕了细胞核后，开始第二期细胞化，此时细胞膜内陷的速度加快，肌动蛋白－膜复合体在即将成为细胞的末端处收缩。在果蝇中，胚层细胞大约有 6 000 个，于受精后的 4 h 内形成。

虽然核原先是在同一胞质中分裂的，但这并不意味着细胞质是均一的。合胞体内的每个核由其自身很小的细胞骨架区域所包围。在第 10 次卵裂过程中，核到达外围胞质，每个核由微管和微

丝包围，核与它们相关的质岛被称为活质体(energid)。

核到达外围后，分裂所需的时间不断延长。第 1 至 10 个周期，每个周期需 8 min；第 13 个周期，也就是合胞体的最后一个核分裂周期需 25 min 才能完成。第 14 次分裂时才形成细胞。第 14 次分裂是不同步的，有的细胞需 75 min 完成第 14 次分裂，有的细胞则需要 175 min。从第 11 次分裂开始，核的转录活动不断增加。果蝇核分裂速度的减慢和 RNA 合成加速的相关性与蛙和海胆胚胎的情况类似。在非洲爪蟾、海胆、海星和果蝇的胚胎中，这种减慢显然是受染色质/细胞质的比值的影响。比较野生型果蝇和单倍体突变株果蝇早胚的发育情况，发现在每次分裂过程中单倍体突变株的胚胎细胞只有野生型一半的染色质。因此单倍体胚胎在第 8 次分裂时的核质比值相当于野生型胚胎第 7 次分裂时的核质比。野生型胚胎于第 13 次分裂时形成细胞层，而单倍体突变株则于第 14 次分裂时形成细胞层，而且野生型第 11～14 细胞分裂周期所花的时间正好与突变型第 12～15 细胞分裂周期的相当。因此单倍体突变株与野生型果蝇具备类似的早胚卵裂，只是时间推迟了而已。

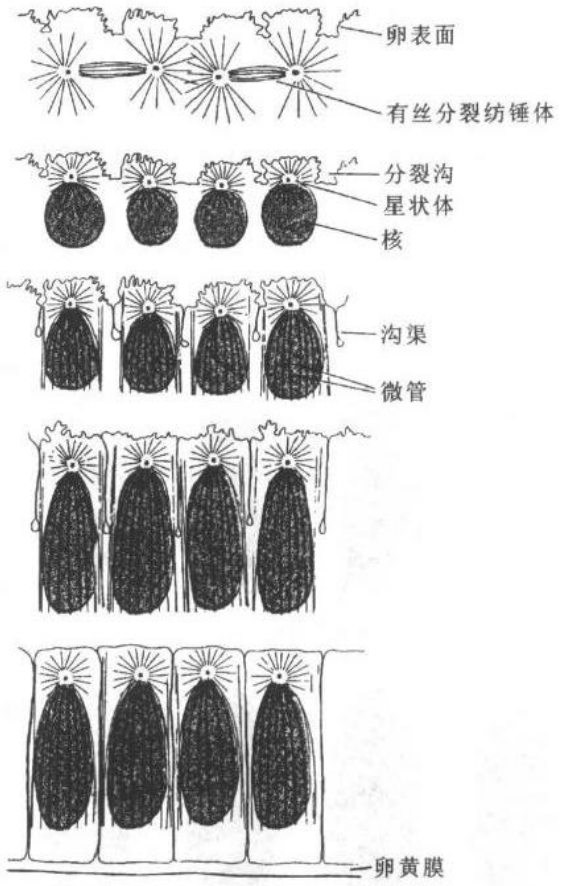


图 3.10 果蝇胚层的核伸长和细胞化的示意图

如果突变株形成细胞层的时间延迟确实是由于核质比变小而导致的，那么去掉一些细胞质，使得单倍体核于一个较小的体积中分裂，就会加速细胞层的形成。事实确实如此。每个核对应 61 μm^3 细胞质时，就会导致卵裂阶段的终止。在非洲爪蟾，第 12 次分裂后，也观察到分裂速度下降的情况，且分裂不再同步化。中囊胚过渡(transition)的时间同样依赖于核质比。单倍体的非洲爪蟾胚胎于第 13 次分裂后发生过渡，而四倍体的胚胎于第 11 分裂后就发生过渡。

在非洲爪蟾和果蝇中，通过人为延长细胞周期的方法，能不成熟地导致细胞运动和转录活动的开始。用放线菌酮抑制蛋白质合成能延长细胞周期，提前诱导非洲爪蟾中囊胚的过渡，并可使果蝇的转录活动明显升高。

第二节　卵裂的机制

一、卵裂周期的调控

体细胞的细胞周期能区分为 4 个阶段(图 3.11A):在核分裂相(M 相)之后有一个 DNA 复制前的间期 G_1 相,DNA 在 G_1 相之后的 S 期中合成,DNA 合成之后又存在一个核分裂前的间期 G_2 相。这些时相的推进是受生长因子调控的。在早期卵裂阶段,细胞分裂相对来说是较简单的。海胆的早期卵裂缺乏 G_1 相,DNA 是在前一次核分裂相的末期进行复制。在非洲爪蟾和果蝇的早期卵裂中均无 G_1 和 G_2 相(非洲爪蟾于第 12 次卵裂后才出现 G_1 和 G_2 相,果蝇于第 14 次卵裂过程中出现 G_2,而在第 17 次分裂过程中出现 G_1 相)。在最初的 12 次分裂中,非洲爪蟾具双相的同步化卵裂周期:S 至 M 相,M 至 S 相(图 3.11B)。

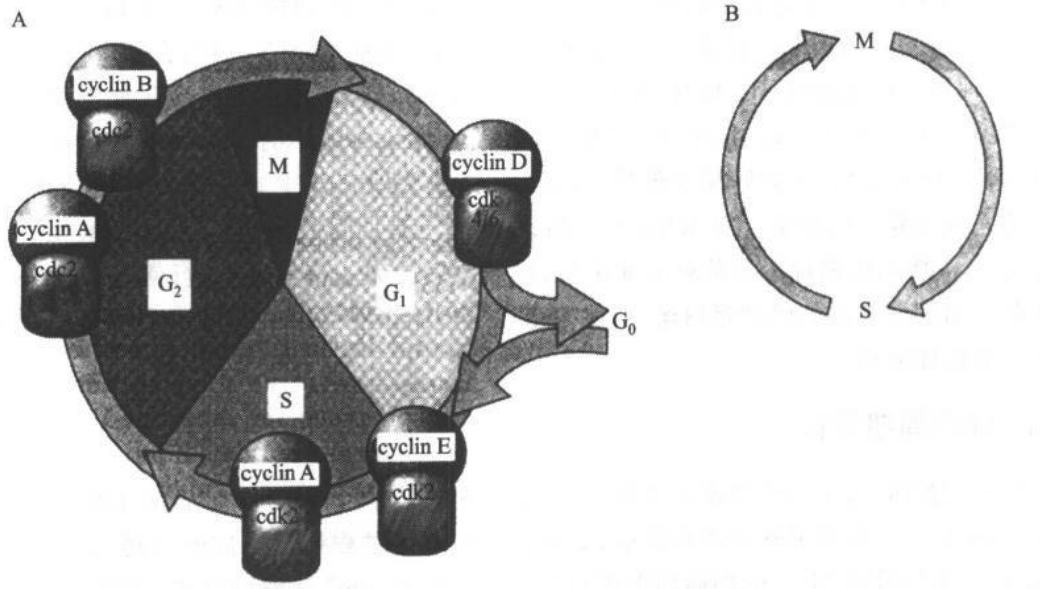


图 3.11　体细胞和早期囊胚细胞的细胞周期

A. 典型的体细胞的细胞周期,间期后为核分裂相(M),间期又可分为 G_1、S 和 G_2 相。正在分化的细胞通常脱离细胞周期,进入一种漫长的 G_0 相。细胞周期蛋白以及它们相应的激酶在其各自的位点上发挥着调控细胞周期的作用　B. 两栖类早期囊胚细胞的细胞周期只有 S 和 M 两相

调控双相周期的因子位于细胞质内。通常长足的非洲爪蟾卵母细胞停留于第一次减数分裂前期。把分裂的体细胞核移植到这些卵中,它们也停止分裂。正常卵在孕酮刺激后恢复减数分裂,却停留于第二次减数分裂中期。如果把不分裂细胞(如神经元)的核置于孕酮处理后的卵质中,它们也开始分裂。即使在没有核和中心粒的情况下,孕酮刺激的卵母细胞的卵质仍发生阶段性的皮质收缩(分裂的特征之一)。如果把克隆的 DNA 片段注射到这种去核的细胞中,它们的复制也处在

周期性调控之下。因此细胞分裂是由卵质调控的。

二、促成熟因子(MPF)

一些控制 DNA 合成和细胞分裂的因子已被确定。由孕酮产生并诱导恢复减数分裂的因子,是由两个亚单位的磷蛋白构成的,被称之为促成熟因子(maturation promoting factor,MPF)。MPF 最先于排出的蛙卵中发现,它具备恢复减数分裂的能力。在受精后的双相周期中,该因子继续发挥着它的作用。在有丝分裂的体细胞中亦具呈周期性改变的 MPF 活性。在早期蛙的卵裂球中,MPF 的活性于 M 相时最高,而在 S 相时几乎检测不到,说明在 S 相中 MPF 处于非活性状态。即使在蛋白质合成受到抑制的情况下,通过 MPF 的活化与失活仍能推动 DNA 的复制和 M 相的发生。与蛋白质合成抑制因子共培养,分裂的细胞可被阻断于间期;当注射 MPF 到这些细胞中,它们都进入 M 相,核膜破裂,染色质浓缩成染色体;1 h 之后 MPF 被降解,染色体又进入 S 相状态。

三、cdc2 激酶

MPF 含有一个小的催化亚基——cdc2 激酶和一个大的调节亚基——细胞周期蛋白。cdc2 激酶为 *cdc*2 基因的产物,是进化中高度保守的分子,M_r 3.4×10^4,简称 p34。p34 以磷酸化和非磷酸化两种形式存在,在 161 位苏氨酸(T-161)磷酸化和 15 位酪氨酸(Y-15)去磷酸化时,才显示出活性,使多种蛋白质磷酸化:① 与 DNA 结合的组蛋白 H1,H1 组蛋白的磷酸化能导致染色体的浓缩。② 核膜中的三种主要蛋白,在加入 MPF 15 min 之后,核膜中的三种细胞骨架蛋白高度磷酸化,在接着的 15 min 内,核膜解聚并破裂。现已证实用纯化的 MPF 也能磷酸化这些核膜蛋白,并在体外使这些核膜蛋白解聚。③ RNA 聚合酶,在有丝分裂期间 RNA 聚合酶的磷酸化可能会导致转录受阻。④ 胞质内肌球蛋白的调节亚单位,磷酸化后会失去活性,不能行使 ATPase 的功能,从而无法驱动细胞分裂时的肌动蛋白丝,对肌球蛋白起抑制作用,可在有丝分裂的早期阶段阻止细胞分裂直至染色体分离。

四、细胞周期蛋白

细胞周期蛋白(cyclin)的合成呈周期性变化,于 S 相末开始合成积累,于 M 相降解。细胞周期蛋白 mRNA 贮存于卵母细胞的细胞质中,如果它们的翻译过程被选择性地抑制,那么细胞就不能进入 M 相。参与组成 MPF 的细胞周期蛋白为 cyclin B,与 cdc2 激酶结合成 MPF 复合物后,可使 cdc2 激酶亚单位的 14 位苏氨酸(T-14)、15 位酪氨酸(Y-15)和 161 位苏氨酸(T-161)磷酸化(图 3.12),其中,T-161 的磷酸化是 MPF 获得活性的必要条件,而 T-14 和 Y-15 的磷酸化则抑制其活性,当后两个位点被磷酸化后,cdc2 激酶处于无活性状态,但具活性的潜能,因而被称为 pre-MPF。在后 S 期,pre-MPF 开始形成并积累增加。MPF 的活化有赖于 Y-15 的去磷酸化。

五、cdc25 磷酸酶

核分裂始于 MPF 催化亚基 15 位酪氨酸(Y-15)的突然去磷酸,而 p34 的去磷酸化依赖于 cdc25 磷酸酶的出现。在果蝇的前 13 个细胞分裂周期中,cdc25 磷酸酶(string 基因的表达产物)的合成始于卵母细胞中贮存的 mRNA。然而,在进入第 14 个细胞周期时,母型 string mRNA 被降解,如果合子型细胞核不转录它们自己的 string mRNA,则细胞就不会分裂下去。事实上,分裂的

细胞确实合成了它们自己的 cdc25 磷酸酶，而不分裂的细胞不合成。这种源自母型 mRNA 的蛋白的降解和通过转录和重新合成该蛋白的需求，将会解释第 14 次分裂时从胞质（母型）控制细胞分裂到核（合子型）控制细胞分裂的转换。

果蝇中，卵成熟和早胚发育过程受活化的 MPF 的调节（图 3.12）。排卵时，贮存于卵中的 pre－MPF 复合物中 T－14 和 Y－15 被翻译出的 cdc25 磷酸酶去磷酸化，所以，在前 7 次核分裂过程中，活化的 MPF 保持高水平，核分裂非常迅速，只要完成 DNA 复制，核分裂即刻开始。到第 8～13 细胞分裂周期，细胞周期蛋白在 M 相开始降解，导致 MPF 激酶活性的周期性波动。由源自卵母细胞的母型 mRNA 合成的细胞周期蛋白为核分裂的限速步骤。由于卵母细胞 string mRNA 合成的蛋白的降解，导致细胞分裂停滞在 14 周期的中期，大量的 pre－MPF 积累。只有当这种 pre－MPF 的 T－14 和 Y－15 位被合子型 cdc25 磷酸酶去磷酸化时，随后的第 14、15、16 次核分裂才能被启动，合子型 cdc25 磷酸酶是在 G_2 相末期由核转录后获得的。这样，核分裂才得以从母型调控转向合子型调控。

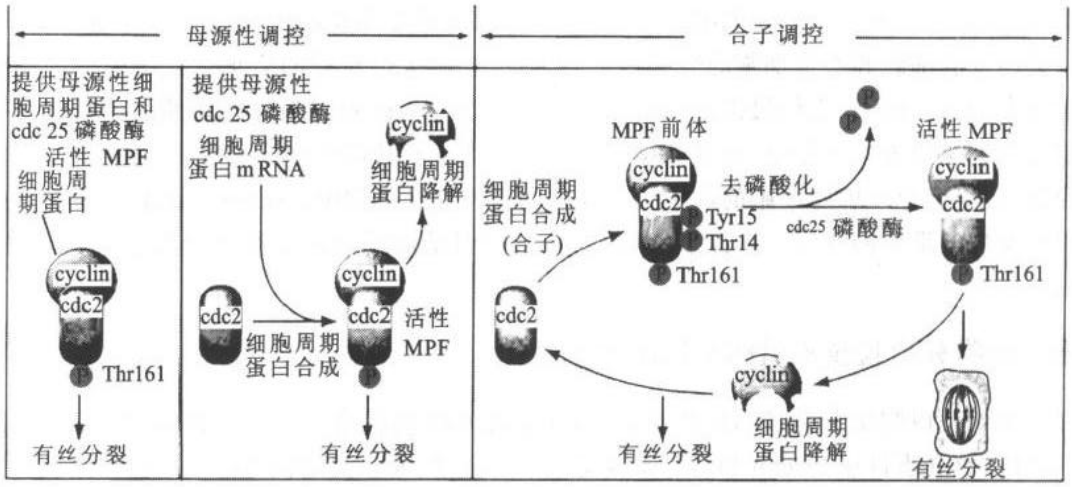


图 3.12　果蝇胚胎发生中细胞周期调控机制的转变

受精过程中，母型细胞周期蛋白和 cdc25 磷酸酶富集，在前 7 次分裂时，MPF 保持很高的激酶活性，核分裂快到所需酶和底物的最大容许程度。第 8 次分裂时，由于细胞周期蛋白的降解，源自卵母细胞的 mRNA 合成的细胞周期蛋白成了核分裂的限速步骤。第 14 次分裂时，母型细胞周期蛋白的 mRNA 消失，因此细胞周期蛋白必须由合子基因表达产生。另外，cdc25 磷酸酶降解，新的蛋白也必须由合子基因表达合成。pre－MPF 虽有积累但无活性，直到 pre－MPF 的 T－14 和 Y－15 位被合子型 cdc25 磷酸酶去磷酸化时才显示活性

六、其他细胞周期蛋白和依赖细胞周期蛋白激酶

MPF 是首先被发现的依赖细胞周期蛋白激酶家族的成员。凡属依赖细胞周期蛋白激酶家族的成员都由一种细胞周期蛋白和一种依赖细胞周期蛋白的激酶（cdk）组成，其中，MPF 的 cdk 称为 cdk1（即 $p34^{cdc2}$）。在成熟的脊椎动物细胞中至少包含有 7 种 cdk，同时，已有十几种细胞周期蛋白也被鉴定出来。在这些 cdk 中，有部分成员的作用已被确定（图 3.11）。在这些依赖细胞周期蛋白激酶的成员中，MPF（cyclin B/cdk1）调控细胞由 G_2 相进入 M 相，而 cyclin E/cdk2 则使细胞获得由

G_1 进入 S 相的能力。

果蝇胚胎在第 14 次分裂周期时，string 蛋白成为限制因素，使果蝇的胚胎细胞分裂周期中增加了一个 G_2 相。第 17 周期时，cyclin E 成为 DNA 复制的限速因素，这时果蝇的胚胎细胞周期中增加了一个 G_1 相。在果蝇胚胎发育的早期，cyclin E 和 cdk2 总是存在的，它们的 mRNA 源自卵母细胞，在前 15 次分裂周期中均能翻译成相应的蛋白质。第 16 次细胞分裂周期时，cyclin E 的 mRNA 降解，导致在第 17 次细胞分裂周期时 cyclin E 蛋白的缺乏。这样，大多数细胞的分裂停留在该周期的 G_1 相，无法进入 DNA 合成期，并开始分化（神经前体细胞和肠道细胞例外，前者可继续增生，后者可在细胞不分裂时继续合成 DNA。它们所需的 cyclin E 可以从合子基因的转录和翻译中获得）。如果 cyclin E 被异位诱导表达，那么停滞的细胞可进入新一轮的 DNA 合成期。目前认为，cyclin E 控制 DNA 的合成是通过磷酸化的特定转录因子，这些转录因子调控着 DNA 复制时所需蛋白的基因转录。另外，当细胞正常地退出细胞周期而开始分化时，它们均表达一种 cyclin E/cdk2 的抑制剂——dacapo 蛋白。

细胞周期蛋白的调控是发育中的关键。想像一下我们大腿软骨细胞多分裂一次，我们会比现在长得更高，若其中的一条大腿的细胞分裂调控有误，这将是很糟糕的事件。同样地，如果软骨细胞的分裂同皮肤细胞和血管细胞的分裂不协调，那也会产生很糟糕的后果。这些事件的调节和协调者是激素与生长因子，它们最终通过调节细胞周期蛋白来控制细胞分裂周期的进行。当一个活化的细胞周期蛋白失去了控制，或者当细胞周期蛋白受突变的调控因子刺激时，细胞的生长将不受外界控制，最终会导致肿瘤细胞的产生。在成熟的脊椎动物细胞中，cyclinD/cdk4，cyclin D/cdk6 在发育中也发挥了重要的作用。在许多细胞类型中，它们是控制细胞分裂和细胞分化的导向标（dichotomy）。

七、细胞分裂检查点：DNA 和纺锤体

细胞周期是由胞质分裂、DNA 复制、纺锤体装配和细胞代谢等参与演出的错综复杂的“舞蹈剧”。在这一整套事件中，cyclin 和 cdk 不仅是调节的靶子，而且又是调节的效应器。细胞周期蛋白激酶系统似乎是这些事件的协调者。例如，只有在 cyclin B/cdk1 发出有丝分裂开始的信号后，有丝分裂的纺锤丝才能形成，而纺锤体的正确装配对 cyclinB 行使正常功能又是必要的，如果纺锤体形成不正确，cyclin B 就会停止发挥作用，有丝分裂也随之停止。另外，在染色质复制和 cdk 之间也存在着一种反馈，例如，核分裂在 DNA 复制之前不会开始，只有当一个复制周期过后才被容许。所以，检查点（check point）是一类维持细胞内各事件（event）之间正常依赖关系的调控机制，其分子机制现在已开始研究。

八、细胞静止因子

MPF 的合成和降解导致了细胞的周期性分裂，然而，如果细胞周期蛋白降解被阻止，MPF 一直保持活性，细胞分裂则停滞于 M 相。在蛙卵成熟过程中就会发生这样的现象。成熟的蛙卵母细胞中产生一种蛋白质，称为细胞静止因子（cytostatic factor，CSF），可使细胞分裂停止。CSF 使卵母细胞停滞在第二次有丝分裂的 M 相，这种蛋白含有 c－*mos* 和 *cdk*2 基因的产物，看起来它是通过阻止细胞周期蛋白的降解而发挥作用。由于细胞周期蛋白不被降解，MPF 始终保持活性，致使卵母细胞一直处于 M 相。受精过程中，钙离子的释放激活了能使 CSF 失活的蛋白酶。当 CSF 降解

时，细胞周期蛋白随后也被降解，这时细胞才能返回到S相。所以，受精过程中钙离子释放所引起的效应之一就是启动细胞周期蛋白的降解，使细胞能进行DNA复制。细胞周期由MPF的活性来决定，而MPF的活性是通过细胞周期蛋白的合成和降解来控制的。当钙离子在推进核分裂完成时，一些能激活蛋白激酶C的受精信号开始引导受精卵进入分裂间期，此时，受精卵的染色质去凝聚，核包被重新形成等。

卵裂是一个由受精卵分裂成多细胞体的过程。卵裂的类型取决于物种的进化史和卵提供胚胎所需营养的能力。一些动物的卵中含有大量的卵黄来支持其胚胎发育到可以进食为止，而有些动物的卵很快发育成能进食的幼虫阶段，因而在卵质中不需大量的卵黄。在哺乳动物，经过特殊形式的卵裂形成的胎盘能提供胚胎营养。然而，在卵裂类型难以置信的复杂情况下，却存在着功能和机制的单一性。在所有情况下，核分裂与胞质分裂必须协调，卵裂成多个细胞区。通过卵裂，核质比例恢复正常，发育的重要信息被集中到不同细胞区域中。对大多数动物而言，早期卵裂是由源自卵母细胞的因子调控的，即母型调控，晚期卵裂则是由合子基因组表达产物调控的，即合子型调控。动物界调控卵裂的生化机制是类似的(如果不是一致的话)，在整个动物界，甚至整个真核生物，细胞分裂的生化机制也可能是一致的。

参考文献

1 Nebreda A R, Ferby I. Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. Curr Opin Cell Biol, 2000, 12(6): 666～75

2 Palmer A, Nebreda A R. The activation of MAP kinase and $p34^{cdc2}$/cyclin B during the meiotic maturation of Xenopus oocytes. Prog Cell Cycle Res, 2000, 4: 131～43

3 Jessus C, Rime H, Ozon R. Ras family proteins: new players involved in the diplotene arrest of Xenopus oocytes. Biol Cell, 1998, 90(8): 573～83

4 Beckhelling C, Ford C. Maturation promoting factor activation in early amphibian embryos: temporal and spatial control. Biol Cell, 1998, 90(6～7): 467～76

5 Dworkin M B, Dworkin～Rastl E. Functions of maternal mRNA in early development. Molecular Reproduction and Development, 1990, 26: 261～297

6 Richter J D. Translational control during early development. Bio Essays, 1991, 13(4): 179～183

7 Andéol Y. Early transcription in different animal species: implication for transition from maternal to zygotic control in development. Roux's Arch Dev Biol, 1994, 204: 3～10

8 Kane D, Kimmel C B. The midblastula transition in zebrafish. Development, 1993, 119: 447～456

9 Lee M S, Ogg S, Xu M, *et al*. Cdc25 encodes a protein phosphatase dephosphorylates p34cdc2. Mol. Biol. Cell, 1992, 3: 73～84

10 Murray A W, Solomon M J, Kirschner M W. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. Nature, 1989, 339: 280～286

11 Sutherland A E, Calarco～Gillam P G. Analysis of compaction in the preimplantation mouse embryo. Dev. Biol., 1983, 100: 327～338

第四章　原肠作用：胚胎细胞的重新组合

原肠作用是胚胎细胞剧烈的高速有序的运动过程，通过细胞运动实现囊胚细胞的重新组合。囊胚由许多细胞构成，囊胚细胞彼此之间的位置是在卵裂期间建立起来的。原肠形成期间，囊胚细胞彼此之间的位置发生变动，重新占有新的位置，并形成由三层细胞构成的胚胎结构：将来形成内胚层和中胚层器官的细胞转移到胚胎内部，而将来形成皮肤和神经系统的细胞在胚胎表面扩展。因此，通过原肠作用，胚胎首先建立起三个胚层，即位于外面的外胚层、位于内部的内胚层和介于内、外两胚层之间的中胚层；其次，为重新占有新位置的胚胎细胞之间相互作用奠定了基础。因此，原肠作用是从尚未分化进入到分化为三个胚层和决定各器官原基的关键时期。

原肠作用的细胞运动涉及整个胚胎，原肠胚一部分细胞的移动必然和同时发生的其他细胞的运动紧密配合。尽管整个动物界原肠作用方式变化多样，但总体可概括为以下五种细胞运动机制。需要指出的是，同一原肠胚常常包括几种细胞运动方式。

(1) 外包(epiboly)　表层细胞(通常指外胚层细胞)整体而不是以单个细胞为单位向外周扩展包绕胚胎深层细胞的细胞运动。

(2) 内陷(invagination)　一个区域内的细胞同时向内凹入，很像一个皮球被用力一戳之后形成的凹陷。

(3) 内卷(involution)　正在扩展的外层细胞向内运动，并沿外层细胞内表面扩展。

(4) 内移(ingression)　胚胎表层细胞单个地向内部迁移。

(5) 分层(delamination)　一层细胞分裂形成两层或多层相互平行的细胞层。

在观察不同类型胚胎的原肠作用时，需注意下列几个问题：

(1) 迁移运动单位　迁移是依靠单个细胞的运动，还是细胞层部分或全部细胞的运动，这一点首先要搞清楚。局部性细胞迁移特性可能完全受胞质因子控制，且控制局部性迁移的胞质因子并不需要细胞分裂就能发挥作用。例如 Lillie 用人工方法诱导燐虫(*Chaetopterus*)卵子激动，并抑制其卵裂，但是早期发育过程中的许多事件在这个人工激动的卵细胞内照常发生：细胞质隔离到特定的区域以及在卵子适当部位分化出纤毛。最有趣的是，卵子最外层透明细胞质沿植物极区域向下迁移，好似正常发育过程中动物极半球细胞下包一样。不仅如此，最外层透明细胞质向下迁移发生的时间也和正常胚胎原肠作用时动物极细胞下包时间一致。

(2) 细胞层扩展或折叠的内因与外因　细胞层的扩展或折叠是由细胞层的内部因子决定还是由外部力量拉伸或扭曲造成的，要想弄清原肠作用中各种细胞运动形式是如何相互配合的，就必须回答这一问题。例如，内卷细胞是否对正在下包的细胞有一个向内的拉力，还是两者是彼此独立的细胞运动？

(3) 细胞层整体或部分运动　原肠作用是整个胚胎组织主动扩展运动，还是运动的前沿细胞

扩展，由此拉动其余部分细胞层被动运动？

(4) 细胞运动性和形状改变的原因 原肠作用期间细胞运动性和形状的改变是细胞表面对基质附着力改变的结果，还是对其他细胞附着力改变的结果？

下面，分别对棘皮动物(海胆)、原索动物(文昌鱼)、鱼类、两栖类、鸟类和哺乳类的原肠作用加以叙述。

第一节 海 胆

海胆囊胚由 1 000 个左右单层细胞构成。这些细胞的细胞质分别来自受精卵不同的区域，所以细胞表现出不同的大小和特性。图 4.1 示海胆由卵裂至形成长腕幼虫的发育图谱。

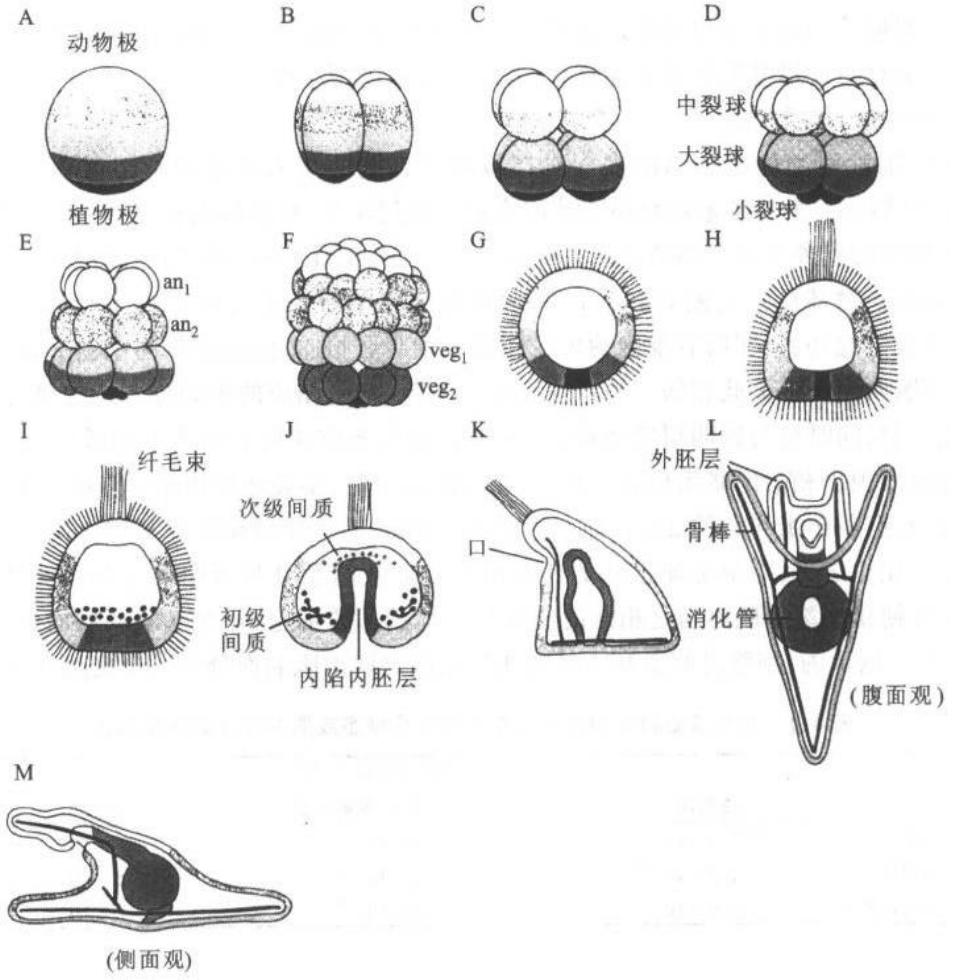


图 4.1 海胆正常胚胎发育

A~F. 早期卵裂 G. 早期囊胚，具纤毛 H. 晚期囊胚，具顶纤毛束和扁平植物极板 I. 具初级间质细胞的原肠胚 J. 具次级间质细胞的原肠胚 K. 三棱幼虫 L,M. 长腕幼虫。受精卵细胞质发育命运用不同深浅颜色表示

一、初级间质细胞的内移

1. 初级间质细胞

囊胚从受精卵中孵化不久，圆形囊胚的植物极一侧开始变厚变平，成为植物极板。在植物极板中央的一簇小细胞开始发生变化：细胞的内表面进行有节奏的抖动，即不断伸出和收缩被称为线状伪足(filopdia)的细长突起($30\times5\mu m$)。然后，这些细胞脱离表面单层细胞，进入囊胚腔。进入囊胚腔的这些细胞叫初级间质细胞(primary mesenchyme cell)，来源于小裂球。海胆胚胎大约有 64 个初级间质细胞，全部来自第 4 次不对称卵裂所形成的 4 个小裂球。

Gustafson 和 Wolpert 曾用定时自动摄影术(time－lapse film)跟踪囊胚腔内初级间质细胞的微观活动。开始，初级间质细胞随机地沿着囊胚腔内表面运动，主动伸出线状伪足与囊胚腔壁连接，又主动脱离连接。最后，这些细胞占据囊胚腔预定腹侧面，并与之形成稳固的联系。在囊胚腔腹侧面，初级间质细胞融合形成索状合胞体(syncytial cable)，最终形成幼虫碳酸钙骨针的轴。新近的研究表明，初级间质细胞的初始迁移运动受囊胚腔壁及其内部广泛分布的细胞外基质构成的平行纤维控制；小裂球可能沿着囊胚腔表面迁移，并包裹在平行纤维中。

2. 囊胚腔内的基质片层

囊胚腔壁细胞的细胞质和细胞表面对初级间质细胞的进入和迁移都很重要。Gustafson 和 Wolpert(1967)提出一个模型来解释小裂球的内移。他们认为，小裂球内移是通过改变与其他细胞以及包绕小裂球的胞外基质之间的连接而实现的。Fink 和 McClay(1985)通过测量海胆分裂球对透明层的亲和力、对基质片层的亲和力以及对其他细胞亲和力的大小变化，证实了 Gustafson 和 Wolpert 的假设。起初，囊胚所有细胞的外表面都与透明层相连，内表面都与细胞分泌的基质片层相连，所有细胞两侧面都彼此相邻。预定外胚层和内胚层(由相应的中裂球和大裂球分裂形成)彼此紧紧连在一起，同时也与透明层紧密联系，但是它们与基质片层的联系很松散(表 4.1)。最初，囊胚小裂球也表现出相似的联系模式。但是，在原肠作用时，小裂球和相邻细胞以及透明层之间的亲和力降低(只有最初亲和力的 2%)，而与囊胚腔内部的基质片层和胞外基质之间的亲和力则增加近 100 倍。相比之下，除小裂球之外的其他细胞彼此之间及其与透明层之间仍保持紧密联系。亲和力的降低使得小裂球脱离与之相连的透明层及其相邻的细胞，并在基质片层的牵拉下进入囊胚腔(图 4.2)。据认为：细胞之间亲和力的变化与细胞之间细胞表面分子发生变化有关。

表 4.1 间质细胞和非间质细胞与不同胚层细胞或胞外组分之间亲和力

细胞类型	离开原位的力/N		
	透明层	原肠胚细胞单层	基质片层
16－细胞小裂球	5.8×10^{-10}	6.8×10^{-10}	4.8×10^{-12}
正在迁移间质细胞	1.2×10^{-12}	1.2×10^{-12}	1.5×10^{-10}
原肠胚外胚层和内胚层	5.0×10^{-10}	5.0×10^{-10}	5.0×10^{-12}

内移至囊胚腔的初级间质细胞被大量胞外片层物质包绕。不仅如此，初级间质细胞一旦进入囊胚腔，便沿着囊胚腔壁的胞外基质伸出线状伪足，向前迁移。沿动植物极轴分布的纤维决定了细胞迁移的方向。至少有三种蛋白质可能在细胞迁移中起重要作用。第一种是纤连蛋白(fibronectin)，它是一种相对分子质量为 4.0×10^5 的糖蛋白，是包括海胆在内的动物囊胚腔内普遍存

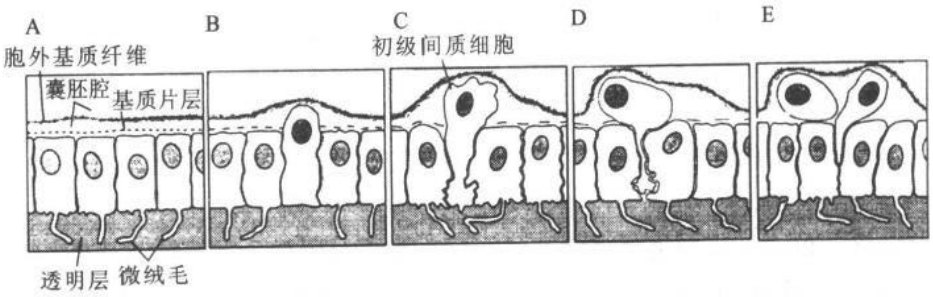


图 4.2 初级间质细胞的内移

示预定初级间质细胞粘连作用的变化。初级间质细胞和透明层以及相邻裂球之间亲和力减少，而与基质片层之间亲和力增加。相比之下，非间质细胞和透明层以及相邻裂球之间亲和力维持不变

在的基质片层组成成分。Fink 和 McClay(1985)证明，在原肠作用期间，小裂球对纤连蛋白的亲和力急剧增加。第二种是内移间质细胞膜上的硫酸蛋白多糖(sulfated proteoglycans)。如果这类蛋白多糖的合成(或硫酸化)被抑制，间质细胞虽然能够进入囊胚腔，但不能进一步迁移。第三种蛋白为 ECM18，它存在于囊胚腔细胞的胞外基质中，只在原肠作用期间表达。用抗体阻断 ECM18，不但能阻止初级间质细胞的迁移，而且阻止内胚层的内陷。

仅有上述三种蛋白还不够，因为小裂球"知道"什么时候停止运动并在囊胚腔赤道附近形成骨针。初级间质细胞沿动植物极轴形成一杯状结构，在将来发育为幼虫腹侧的两侧位置上，许多初级间质细胞聚集并开始形成骨针(图 4.3)。如果把来自另外一个胚胎经过标记的小裂球注入正在进行原肠作用的囊胚腔中，它能够迁移到正确的位置上并参与形成骨针；如果把来自一个年老胚胎的初级间质细胞注入较年幼的原肠胚中，它们就会推迟分化，而像年幼初级间质细胞一样迁移，并发育成为宿主胚胎的间质；如果先把宿主胚胎所有初级间质细胞除去，再注入年老间质细胞，那么年老的间质细胞就会重复其早先的迁移运动，形成正常的间质细胞，并产生骨针。据认为，与间质细胞定位有关的位置信息(positional information)由预定外胚层细胞及其基质片层所提供。只有初级间质细胞能产生上述迁移和定位反应，其他类型细胞以及塞入囊胚腔内的乳胶小球均不具备这种能力。Miller 等曾报道，骨骼形成间质细胞(skeletonogenic mesenchyme)具有极细的线状伪足(直径 0.3 μm)，可以探测和感知囊胚腔壁。这些线状伪足中含有肌动蛋白，但并不用于运动，而像轴突生长锥顶部的线状伪足一样，用以感知环境变化。它们在形态建成过程中，可能参与辨别外胚层背腹侧和胚胎动植物极轴。

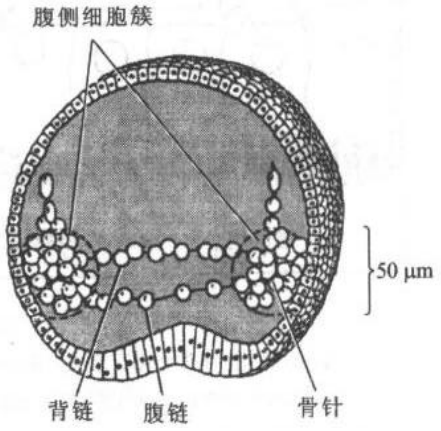


图 4.3 早期原肠胚初级间质细胞排列示意图

二、早期原肠内陷

当初级间质细胞在囊胚腔的植物极区域形成初级间质细胞环时，仍然保留在植物极板上的细胞也在发生变化。这些细胞彼此之间以及与卵子透明层之间仍然保持联系，并移动、填补由初级间

质细胞内移而形成的空隙。因此，植物极板进一步变扁平。之后，植物极板向内弯曲，内陷。当植物极板内陷深及囊胚腔的 1/4～1/2 时，内陷突然停止。所陷入的部分称为原肠(archenteron or primitive gut)，而原肠在植物极的开口称为胚孔(blastopore)。

是什么力量驱使植物极板细胞内陷的？Lane 等证明，植物极板弯曲如同加热一个双层金属长片一样。透明层实际上是由两个片层组成，外层主要由透明蛋白(hyalin protein)组成，内层由 fibropellin 蛋白组成。植物极板细胞而且唯有植物极板细胞向紧位于其下的透明层内层分泌硫酸软骨素蛋白多糖(chondroitin sulfate proteoglycan，CSPG)。硫酸软骨素蛋白多糖是一种吸水分子(hygroscopic molecule)，吸水后使透明层内层膨胀，而透明层外层并不膨胀，其结果导致植物极区域透明层弯曲(图 4.4)。稍后，与植物极板毗邻的表层细胞运动又产生一种动力，拉拽向内弯曲的植物极板内陷。

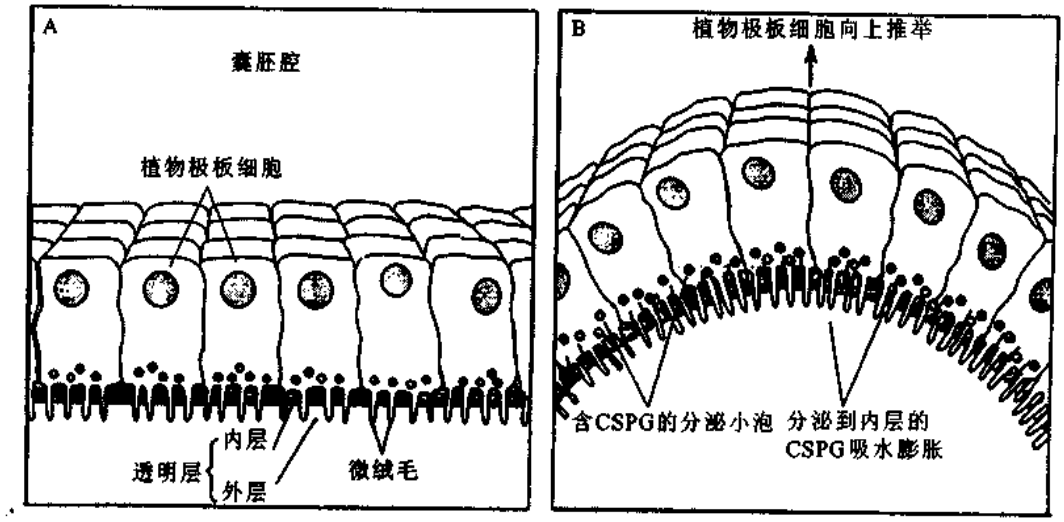


图 4.4 植物极板的内陷

A. 透明层由内、外两个片层组成。由植物极板细胞伸出的微绒毛插入透明层中；植物极板细胞的细胞质中含有贮存着硫酸软骨素蛋白多糖(CSPG)的分泌小泡 B. CSPG 由分泌小泡分泌到透明层内层中，CSPG 吸水使透明层内层膨胀，而与内层相连的外层并不膨胀，其结果是导致透明层弯曲，相连的细胞层内陷

三、晚期原肠内陷

植物极细胞的内陷可以分为三个不连续阶段。早期原肠内陷完成之后，经过短暂停歇，原肠形成的第二时期开始了。在此期间，原肠大幅度拉长，有时达原来长度的 3 倍。拉长过程中，又粗又短的原肠变成又细又长的管状结构。然而，在此期间并没有新细胞形成(图 4.5)。原肠的拉长是通过细胞重排，使一个细胞迁移后正好搭在另一个细胞上，原肠周长内细胞数目大为减少，并辅之以细胞变扁平而实现的。这种细胞插入重排使组织变细同时向前延伸的现象称为集中延伸(convergent extension)。

至少在几种海胆中，原肠出现第三个延长时期。在此期内，原肠延伸是以次级间质细胞提供的张力为动力的。次级间质细胞在原肠顶端形成，并维持在原肠顶端。次级间质细胞伸出线状伪足，

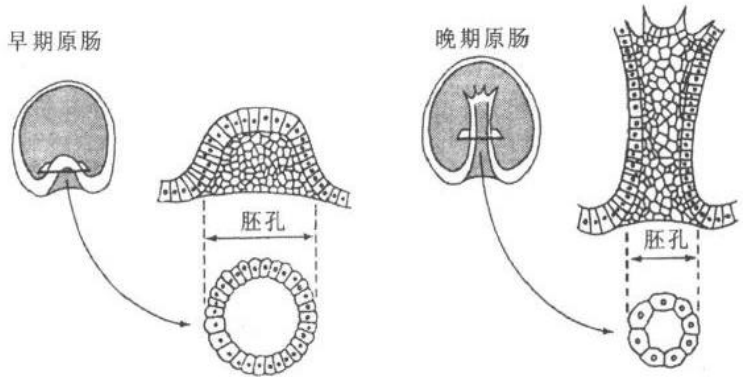


图 4.5 海胆胚胎原肠伸长时的细胞重排

早期原肠周长大约由 20～30 个细胞组成，至原肠晚期，原肠周长只有 6～8 个细胞组成

穿透囊胚腔液直达囊胚腔壁内表面。它们在胚层细胞彼此之间的连接处与囊胚腔壁相连接，然后缩短，牵拉原肠延伸。Hardin 用激光破坏次级间质细胞，结果原肠只延伸至原有长度的 2/3。如果破坏不彻底，还剩下少数几个次级间质细胞，那么，原肠能继续延伸，但延伸速度缓慢。这些次级间质细胞在内陷的最后阶段对于将原肠牵拉至囊胚腔壁起至关重要的作用。

次级间质细胞的线状伪足是否能附着到囊胚腔壁的任何位置，或者说动物极半球是否存在着次级间质细胞附着的“靶位”？Hardin 和 McClay(1990)认为，动物极半球的确存在着不同于其他区域的“靶位”。次级间质细胞伸出的线状伪足能随机和囊胚腔壁上任何一点接触，但是，线状伪足在多数接触点缩回来，只有在少数接触点不但保持接触，而且变扁平扩展开来，并将原肠向接触点处牵拉。当用外力向内压迫囊胚腔的一侧以便伪足更容易与这一区域接触时，次级间质细胞的线状伪足继续延伸，但在接触到这一区域后马上缩回；只有当线状伪足接触到特定靶位时，才不会缩回。如果结扎原肠胚，使线状伪足不能接触到特定靶位，则这些次级间质细胞不断试探寻找靶位，直至脱离原肠以自由迁移细胞的形式与特定靶位结合。次级间质细胞的特定靶位可能位于将来形成口的区域。

当原肠最顶端接触到囊胚腔壁时，次级间质细胞分散进入囊胚腔。它们在囊胚腔中分裂，最终形成中胚层器官。囊胚腔壁接触到原肠的位置最终形成口，口和原肠最顶端形成一连续相通的消化管。海胆作为后口动物，其胚孔位置最终形成肛门。

第二节 文 昌 鱼

文昌鱼被认为是和脊椎动物亲缘关系最近的无脊椎动物。其成体结构和胚胎发生过程与无脊椎动物有相似之处，如表皮为单层上皮，结缔组织不发达，胚胎具纤毛能在水中游动等。另一方面，文昌鱼和脊椎动物也有一些共同特征：具有脊索和位于脊索背部的神经管，具有鳃裂和体节，胚胎发生时期有消化管和神经管相通的神经肠管(neurenteric canal)等。因此，研究文昌鱼胚胎发生对探讨脊椎动物起源具有重要意义。

文昌鱼囊胚由包围囊胚腔的单层细胞构成。原肠作用开始时，植物极预定内胚层细胞伸长，形

成扁平加厚的植物极板。植物极板向内弯曲内陷。此时的原肠胚与两栖类的原肠胚不同，背唇和腹唇很难分辨。内陷的细胞层逐渐挤压囊胚腔而与动物极细胞靠近，最终形成一由双层细胞构成的杯状结构(图 4.6)。外面一层为外胚层，以后分化成表皮和神经系统；里面一层为中胚层和内胚层，也称为内中胚层(endomesoderm)，以后分别分化成脊索、肌节和消化管。至于植物极板内陷的机制，迄今尚一无所知。

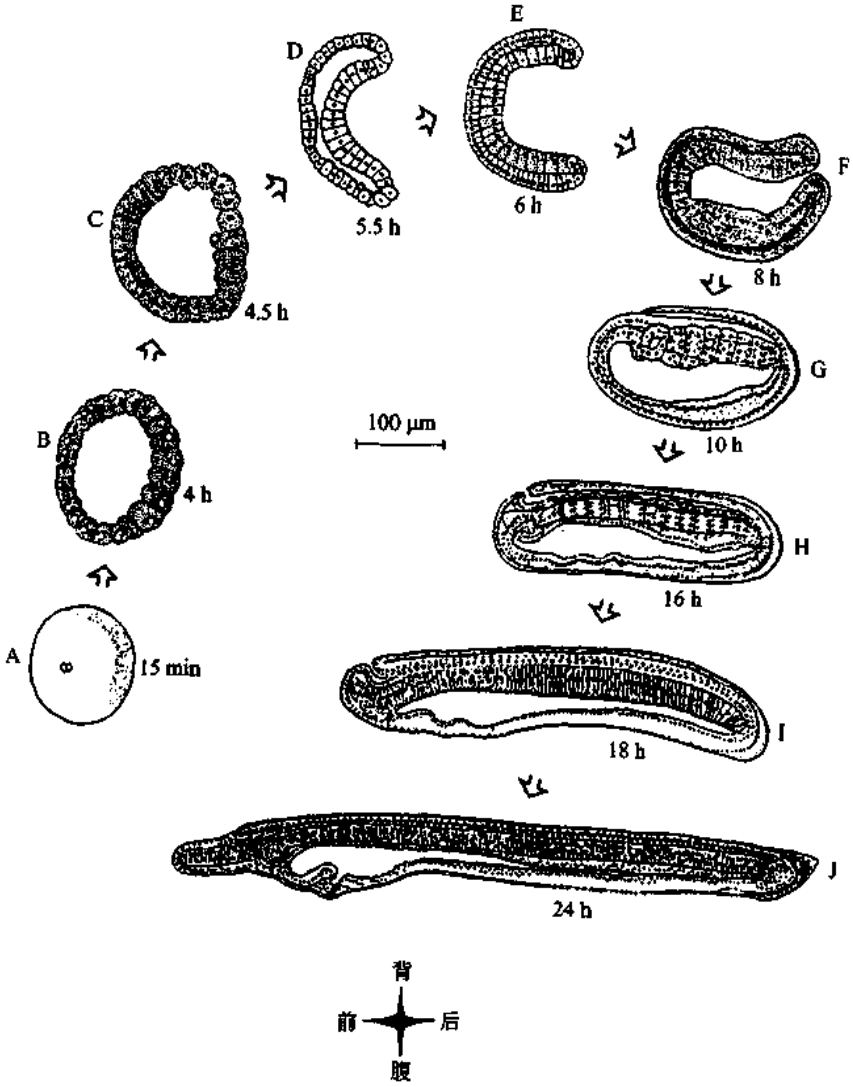


图 4.6 文昌鱼胚胎早期发育

A. 受精卵 B. 囊胚 C. 早期原肠胚 D. 杯状原肠胚 E. 晚期原肠胚 F,G. 神经胚 H,I. 孵化后的幼虫 J. 1d 幼虫

文昌鱼原肠作用方式除植物极板内陷之外，还包括胚唇细胞的内卷。以前，对文昌鱼胚唇细胞是否内卷的描述颇为混乱。有人认为，文昌鱼原肠胚胚唇细胞根本不发生内卷；也有人认为，文昌鱼原肠胚整个胚唇细胞都内卷，尤其是背唇细胞内卷更为明显；还有人认为，文昌鱼原肠胚只有腹

唇和侧唇细胞内卷，而背唇细胞不内卷。最近，Zhang 等(1997)用活体观察方法澄清了这一问题。他们用脂溶性活性染料 DiI 标记文昌鱼早期原肠胚，然后在荧光显微镜下跟踪所标记细胞的迁移运动。结果发现，所有胚唇细胞都发生一定程度内卷，且内卷程度在背唇、腹唇以及侧唇之间看不出有明显区别(图 4.7)。究竟是什么因素驱使文昌鱼原肠胚唇细胞内卷，尚未见有报道。

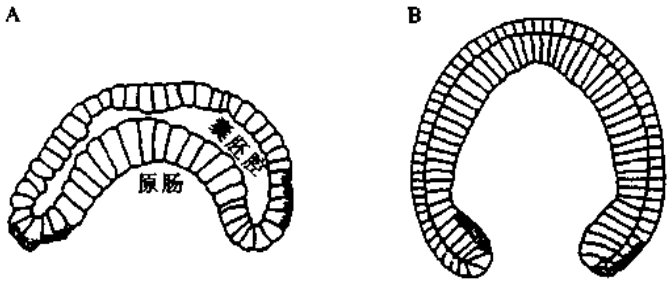


图 4.7 DiI 标记示意图

A. 杯状原肠胚 B. 晚期原肠胚

阴影部分代表 DiI 标记位置。到晚期原肠胚时，可以看出标记部分发生了内卷

第三节 鱼 类

一、中期囊胚转换和细胞运动性的获得

在斑马鱼第 10 次卵裂期间，细胞分裂不再同步，新的基因开始表达，且细胞获得运动性。这种现象称为中期囊胚转换(midblastula transition，MBT)。中期囊胚转换在蛙类和果蝇属中也能见到。MBT 似乎受染色质和细胞质之间的比例控制。单倍体鱼类囊胚较正常二倍体鱼类囊胚晚一个分裂周期进入 MBT，而四倍体鱼类囊胚比正常二倍体鱼类囊胚早一个周期进入 MBT。据认为，染色质中的某些物质可以"测定出"来自细胞质的某些物质的变化。

鱼类胚胎中最早的细胞运动是胚盘细胞沿卵黄四周下包。初始阶段，胚盘内层细胞向外周迁移，插入表层细胞中。稍后，表层细胞沿卵黄表面下包，直到将卵黄全部包围起来(图 4.8)。沿卵黄表面下包的表面细胞层称为包被层(enveloping layer，EVL)。包被层细胞的下包运动，并非由分裂球主动移动引起，而是由卵黄合胞体层(yolk syncytical layer，YSL)自动扩展引起的。卵黄合胞体层是位于胚盘下面卵黄表面含有多个细胞核的一层细胞质层。包被层和卵黄合胞体层紧密相连，卵黄合胞体层的自动扩展必然拉动与之相连的包被层细胞向下移动。随着下包运动的进行，卵黄合胞体层和包被层之间产生的空隙由胚盘深层细胞所填充。卵黄合胞体层的扩展拉动包被层细胞向下运动这一点，可以通过切断卵黄合胞体层和包被层两者之间的联系来证明。当卵黄合胞体层和包被层两者之间的联系被切断后，胚盘细胞会反弹缩回到卵黄顶部，而卵黄合胞体层则继续包绕卵黄扩展。卵黄合胞体层的扩展受其中的微管系统控制，用辐射或药物处理阻断微管聚合就能抑制下包。

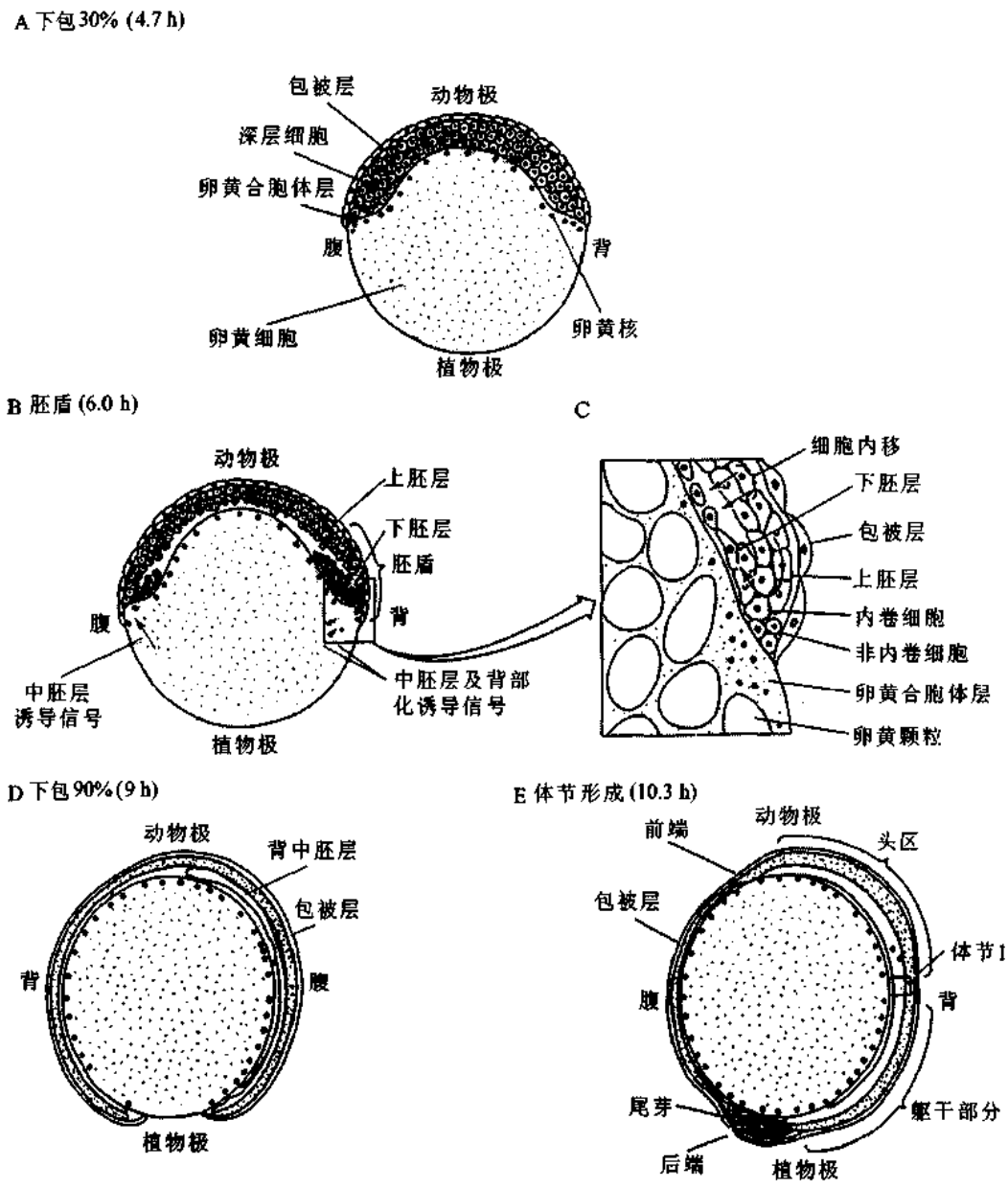


图 4.8 斑马鱼原肠作用期间的细胞运动

A. 下包完成30%的胚盘 B. 通过下包胚盘边缘细胞内卷或上胚层细胞分层形成下胚层 C. 边缘区域特写镜头 D. 完成下包90% E. 原肠作用结束

二、胚层形成

当斑马鱼胚盘细胞包绕一半的卵黄时(卵黄较多的鱼更早),包被层四周边缘区开始加厚。这个加厚的区域叫胚环(germ ring),它是由外层上胚层(epiblast)和内层下胚层(hypoblast)构成。目前尚不知道下胚层是如何形成的。有人认为,下胚层是边缘表层细胞向里面内卷继而向动物极迁移形成的(图 4.9)。内卷开始于将来发育为胚胎背部的区域,但可扩及整个四周边缘。也有人认

为，下胚层由细胞内移形成。很可能以上两种机制都在发生作用，只是在不同种类的胚胎中某一种占优势而已。下胚层一旦形成后，上胚层和下胚层的深层细胞都会向将来发育成为胚胎背部的一侧插入，形成一个加厚的区域，称为胚盾(embryonic shield)。胚盾在功能上相当于两栖类的背唇，如果将它移植到宿主胚胎中，能够诱导形成次级胚轴。

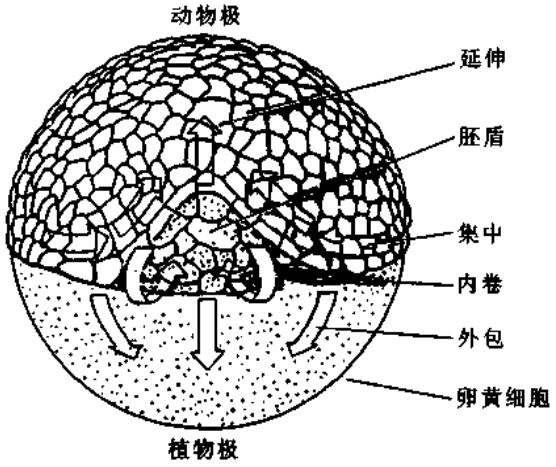


图 4.9 斑马鱼原肠作用时细胞的集中和延伸(背部观)

胚盘沿卵黄扩展；内卷或内移形成下胚层；集中和延伸把下胚层和上胚层细胞带到背部形成胚盾。在胚盾内，细胞插入、重排，使脊索中胚层向动物极延伸

当细胞沿卵黄下包时，它们也在边缘内卷，并朝背部和前端两个方向向胚盾集中。胚盾下胚层细胞向前端集中和延伸，最终沿背中线变成一窄条，它就是脊索中胚层(chordamesoderm)，即脊索的原基。与脊索中胚层毗连的细胞为近轴细胞(adaxial cell)，是中胚层体节的前体。上胚层细胞通过集中和延伸，将脑细胞集中在背中线上，并形成神经龙骨(neural keel)；其余的上胚层细胞发育成鱼类的皮肤。由此可见，斑马鱼的发育图谱与蛙和其他脊椎动物的发育图谱并无很大区别。

第四节 两 栖 类

两栖类原肠作用的研究是实验胚胎学中最古老也是最新兴的一个领域。虽然对两栖类的原肠作用进行广泛研究已长达一个多世纪，但是，大多数关于原肠胚细胞运动机制的理论在过去十多年中已被重新修正。各种两栖类并不遵循同一方式进行原肠作用，这使对两栖类原肠作用的研究变得更为复杂。近年来，对非洲爪蟾原肠作用的研究较为深入。下面主要讨论非洲爪蟾的原肠作用机制。

一、两栖类原肠作用时细胞的运动

两栖类囊胚与棘皮动物和鱼类的囊胚所面临的基本任务完全相同，即把终将形成内胚层器官的细胞拖入胚胎内部，把终将形成外胚层的细胞置于胚胎四周，而把终将形成中胚层的细胞置于外胚层和内胚层之间适当的位置。这一运动过程可以通过活体染色观察到(图 4.10)。Vogt(1929)将活性无毒染料如中性红或硫酸尼罗蓝浸泡过的琼脂片贴到囊胚表面，使接触到琼脂片的胚胎细胞染上颜色，然后跟踪着色细胞在原肠作用时的迁移运动，并将结果总结绘制成发育命运图谱。有关扫描电镜和染料注射的研究不但证实而且扩充了 Vogt 所绘制的发育命运图谱。

活体染色证明，位于表层和深层的非洲爪蟾囊胚细胞分别具有不同的发育命运。非洲爪蟾的中胚层前体只存在于深层细胞中，具体说，位于赤道区域表面细胞下面，而外胚层和内胚层则来自

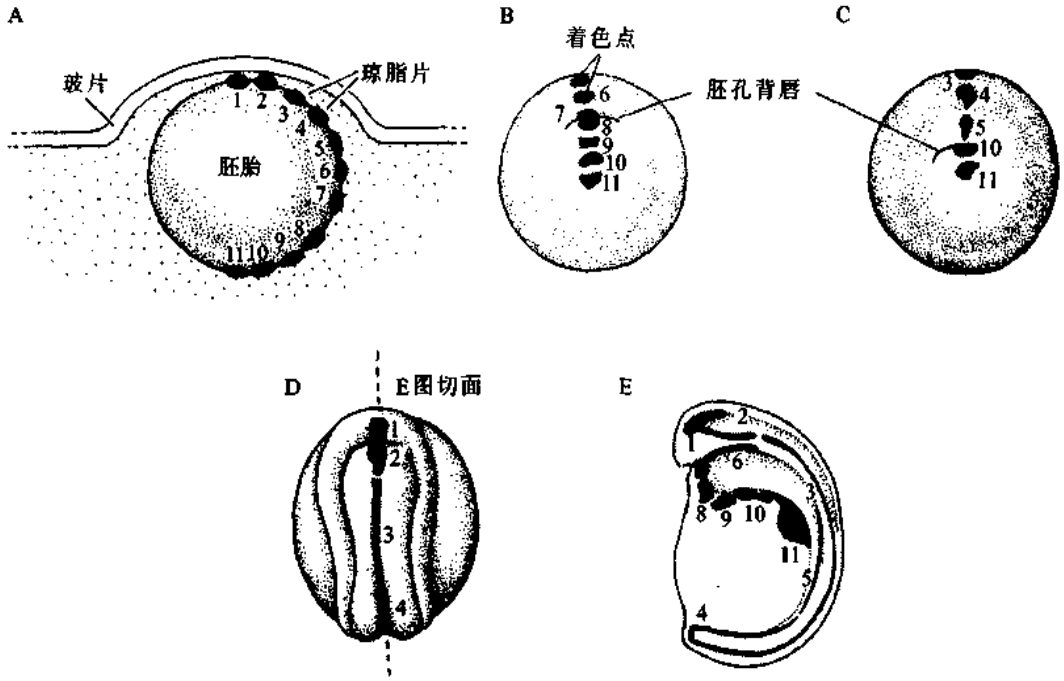


图 4.10 两栖类胚胎活体染色

A. 用活体染料标记胚胎表面特定细胞 B~D. 标记细胞表面观，注意标记细胞的迁移运动 E. 将蝾螈胚胎沿中线解剖开来，示内部标记细胞

于表面的表层细胞(图 4.11)。另一方面，在有尾两栖类(*Triturus* 和 *Ambystoma*)以及非洲爪蟾以外的某些蛙类囊胚中，中胚层前体可同时在赤道处的表面和深层细胞中找到。

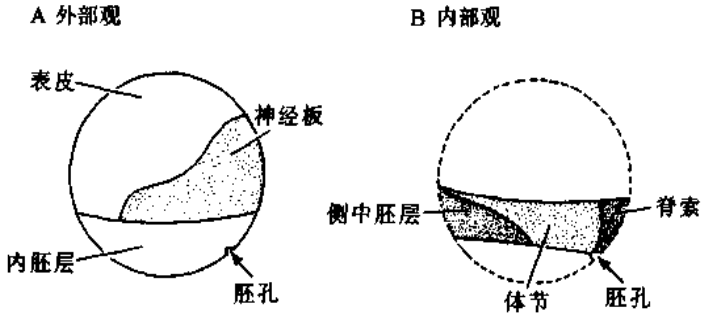


图 4.11 非洲爪蟾囊胚外层细胞(A)和内部细胞(B)发育命运图谱

大部分中胚层细胞来源于内部细胞。箭头示胚孔背唇形成处

蛙类原肠作用首先是从将来胚胎的背部，即刚好在赤道下方的灰色新月区开始的(图 4.12)。在这一区域，局部的预定内胚层细胞内陷，形成狭缝状胚孔(slit - like blastopore)。内陷细胞形状发生剧烈变化：细胞主体部分向胚胎内部移动，但仍通过细长的瓶颈样结构与胚胎外表面相通。这些细胞看似花瓶，故有瓶状细胞(bottle cell)之称，它们沿最初的原肠排列。因此，像正在进行原肠作用的海胆胚胎一样，蛙类囊胚细胞内陷同样引发原肠形成。不过，与海胆不同，蛙类原肠作用并不是在最靠近植物极处开始内陷，而是在动物半球和植物半球汇合的赤道附近，即所谓的缘区

(marginal zone)开始内陷。赤道附近的内胚层细胞并不像最靠近植物极处的裂球那样体积大且含卵黄多。

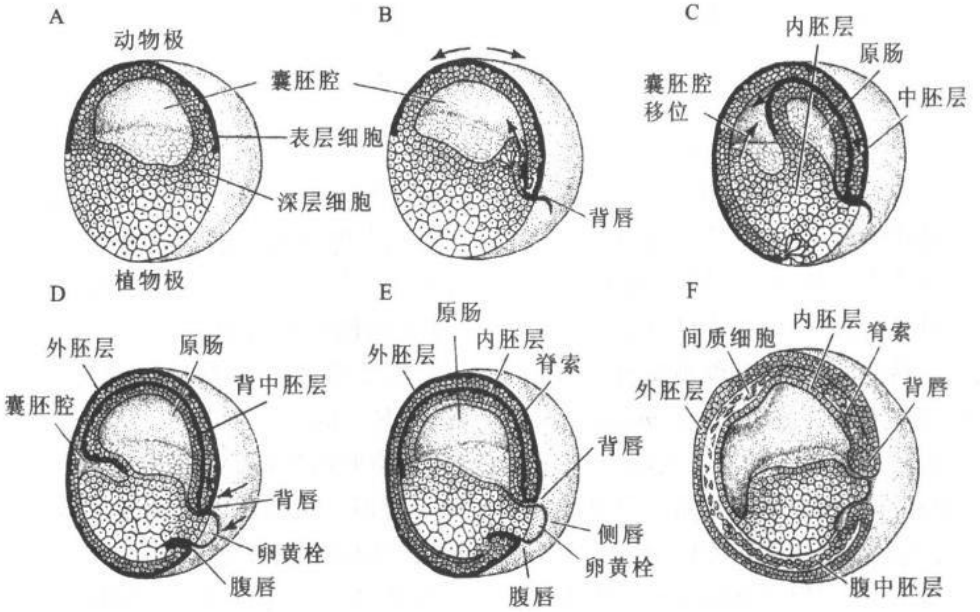


图 4.12 两栖类原肠作用时的细胞运动

胚胎沿中线切开,植物极朝向下方。主要的细胞运动用箭头指出。原来位于动物极半球表面的细胞用较深颜色表示

A. 囊胚 B. 原肠作用开始 C. 背唇细胞内卷,囊胚腔壁下方形成原肠,原肠挤压囊胚腔 D,E. 细胞通过背唇、侧唇以及腹唇内卷,外胚层细胞向植物极半球迁移。卵黄栓成为表面唯一可见的内胚层细胞 F. 原肠作用继续,直至整个胚胎被外胚层包围,内胚层进入内部,而中胚层位于内、外胚层之间

原肠作用的下一个时期包括缘区细胞的内卷以及动物半球细胞的外包和向胚孔处集中。迁移中的缘区细胞到达胚孔的背唇时,转向内部沿着外层细胞的内表面运动,因此构成背唇的细胞在不断更换。最初构成背唇的细胞为内陷形成原肠前缘的瓶状细胞,它们最后发育为前肠咽部的细胞。随着瓶状细胞进入胚胎内部,背唇被后来内卷进入胚胎发育为头部中胚层前体的细胞代替。接下来,由胚孔背唇内卷进入胚胎的细胞为脊索中胚层细胞,它们将形成脊索。脊索是一个临时的中胚层"脊柱"(backbone),它对诱导神经系统的分化起重要作用。

随着新细胞进入胚胎,囊胚腔被挤压到与背唇相对的一侧。同时,随胚孔处瓶状细胞形成和内卷的继续,胚唇向侧面和腹面延伸,形成新月状的结构。新月状胚孔进一步延伸,先形成侧唇,再形成腹唇。通过侧唇和腹唇,位于外胚层细胞中的中胚层和内胚层细胞继续内卷,使胚孔形成一环状,包绕在含有大量卵黄、体积较大的内胚层细胞周围;这些内胚层细胞仍然暴露在植物极外面,形似栓状,故有"卵黄栓"(yolk plug)之称。最终,卵黄栓也被包入内部。至此,所有内胚层细胞都已进入胚胎内部,外胚层细胞包被胚胎表面,而中胚层细胞则位于内胚层和外胚层之间。

二、胚孔的定位

明白两栖类原肠作用的一般特征后,现在可以详细讨论原肠作用每一个具体过程了。原肠作用并不是动物生命中孤立存在的一个过程。事实上,原肠作用的准备工作可以追溯到精卵的结合。

未受精卵沿动植物极存在一个极性。未来三个胚层的区域划分在未受精卵就可以确定:动物极半球表层细胞质发育为外胚层细胞(皮肤和神经),植物极半球表层细胞质发育为肠细胞及其相关的器官(内胚层),而中胚层细胞则由赤道周围的内部细胞质形成。因此,在未受精卵上就能勾画出胚层图谱。但是,我们并不知道卵子的哪一部分形成背部,哪一部分形成腹部,胚胎的背腹轴、前后轴和左右轴在卵子中也难以确定。

背腹轴和前后轴是在受精过程中由受精卵细胞质隔离决定的。受精后,卵子内部的细胞质由于大量致密卵黄颗粒的存在,仍然维持依据重力定向的位置,而皮层部分的细胞质则主动朝精子入卵点方向向动物极旋转 30°。由于皮层细胞质的旋转,使得卵子表面的动植物极轴与细胞质内部的动植物极轴两者相差 30°。这样,便形成了一个新的对称状态。虽然未受精卵细胞质沿动植物极轴呈辐射对称分布,但受精卵已具备了背腹轴,已变成两侧对称结构,可以区分出左右侧了。在皮层细胞质旋转的同时,内部细胞质也发生运动。对早期胚胎进行荧光显微镜观察表明,预定背部细胞和预定腹部细胞的胞质图式(cytoplasmic pattern)明显不同。

上述细胞质的运动激活精子入卵点对面的细胞质开启原肠作用。精子入卵点代表胚胎未来腹面,而与之相对的一面即原肠作用开启处代表胚胎未来背面。虽然诱发卵细胞质运动并不需要精子,但精子对决定细胞质旋转方向至为关键。如果把人为激动的卵子细胞核去掉,皮层细胞质旋转照样在正确时间发生,但其旋转方向变得不可预测。因此,精子好像仅提供空间暗示,决定细胞质自动旋转方向,而在未来胚胎发育中起主要作用的是细胞质的旋转。如果皮层细胞质旋转被阻断,胚胎就不会形成背部,只发育成由腹部(原肠)细胞构成的一团细胞。由此可见,卵子哪一侧形成背部,哪一侧又形成腹部,完全由细胞质运动方向决定。

由精子入卵点引发的皮层细胞质旋转方向的偏转,可以通过机械方法重新改变皮层细胞质和皮层下细胞质的空间关系来修正。如果把受精卵浸入多糖,卵子和受精膜之间的卵周隙就会萎缩,卵子也不能自由转动。这时,可以人为地将卵子转动 90°,使卵子动植物极呈水平方向排放而不是垂直方向排放,同时使精子入卵点朝向正上方。如果受精卵维持这一状态 30 min,即第一次卵裂周期进行过半时,那么,由于细胞质的旋转将使几乎所有胚胎在精子入卵点同一侧开启原肠作用。

由此可以看出,如果将精子决定的细胞质旋转与人工诱导的细胞质旋转相结合,就可能获得两个原肠作用起点。Black 和 Gerhart(1985)在精子定向的受精卵细胞质旋转发生之后,将受精卵固定在明胶中轻轻离心,使得内部细胞质朝着精子进入点方向运动。当离心后的受精卵放在正常生理盐水中发育时,同时在两点开启原肠作用,最终形成连体双胞胎蝌蚪。据认为,这种连体双胞胎蝌蚪的形成是由于正常的皮层细胞质旋转形成的一个胚轴和离心驱动的胞质运动形成的另一个胚轴两者之间相互作用所致。如果转动受精膜内的受精卵,使精子入卵点朝向正上方,在正常作用力下也能形成连体双胞胎蝌蚪。

两栖类胚胎具有形成两个有功能胚唇的能力,这说明未来原肠作用开启处的灰色新月并无什么独特之处。相反,原肠作用诱导因子好像是通过动物极细胞质和植物极细胞质两者之间相互作用产生的。动、植物极之间细胞质的相互作用可能激活植物极细胞质中的组分。移植实验表明,开启原肠作用的因子原来位于受精卵将形成背部的植物极细胞的深层细胞质中,而不是位于灰色新月中。在非洲爪蟾 64 - 细胞胚胎中,背部最靠近植物极的 3 个裂球可以诱导经 UV 照射过的胚胎形成背唇和完整的背轴(图 4.13)。不仅如此,背部植物极 3 个裂球正好位于预定背唇区,当它们被移植到另一正常胚胎腹部时,还能诱导毗邻的缘区细胞内陷即次级内陷(secondary invagina-

tion),并形成背部中胚层轴即次生胚轴(secondary axis)。在非洲爪蟾 16－细胞胚胎中,如果把背部植物极裂球的皮层细胞质移植到腹部植物极细胞内,也能够诱导形成次生胚轴。而移植动物极裂球的皮层细胞质和腹部裂球的深层细胞质都不能诱导形成次生胚轴。

综上所述,正常情况下由精子驱动的内部细胞质的重新排列能够引起亚细胞因子(subcelluar factor)不对称分布;受精卵内亚细胞因子的不对称分布产生了背腹区分,并最终将胚孔的位置确定在精子入卵点对面的一组植物极裂球上。

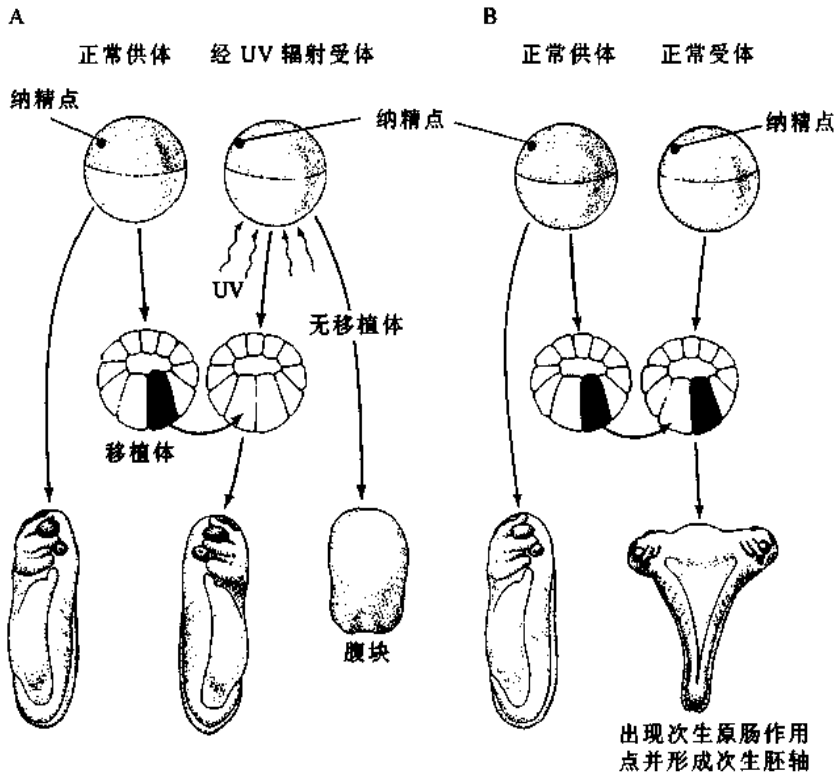


图 4.13 预定背唇区域下方植物极细胞移植实验

A. 在 64－细胞期,把背部最靠近植物极的裂球移植到另一经 UV 照射过的同期胚胎中。经 UV 照射过的胚胎不能进行原肠作用,但移植进裂球后能进行原肠作用 B. 在 64－细胞期,把背部最靠近植物极的裂球移植到另一同期胚胎腹部最靠近植物极的区域,后者能产生次生原肠作用并形成次生胚轴

三、细胞运动和原肠构建

1. 原肠作用的开始

当囊胚背部表面缘区一群内胚层细胞下陷时,两栖类的原肠作用就开始了。这些细胞的外表面(顶端)剧烈收缩,而内表面(基底)则扩张。因此,这些细胞由顶端到基底长度大大增加并形成瓶状。在蝾螈胚胎中,瓶状细胞对胚胎原肠作用早期的细胞运动起主动作用。Holtfreter(1944)发现,蝾螈早期原肠胚的瓶状细胞能够附着到盖玻片上,并牵动与之相连的细胞运动。在重组实验中,将分离下来的背部缘区细胞放置在预定内胚层细胞上,结果背部缘区细胞形成瓶状细胞,并陷入内胚层细胞内部(图 4.14)。Holtfreter 认为,内陷进入内胚层的能力是背部缘区细胞固有的属性。

蛙胚情况有所不同。非洲爪蟾的瓶状细胞尽管在变成瓶状时能够启动缘区细胞内卷,但并不

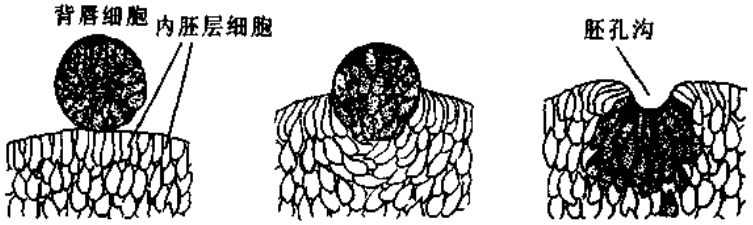


图 4.14 两栖类胚胎背唇区域细胞移植到内胚层细胞上，下陷进入内胚层细胞中，形成胚孔沟

是原肠作用继续维持所必需的。这些细胞特殊的瓶状结构对于启动原肠作用是重要的，正是这些细胞的收缩在推动植物极细胞向内运动的同时，向植物极牵拉缘区细胞(图 4.15)。植物极缘区细胞的拉拽又使外胚层细胞向植物极扩展，不断包被胚胎，而植物极细胞的推动则使前端中胚层前体和后端中胚层前体下方接触，并开始沿囊胚腔顶壁迁移。

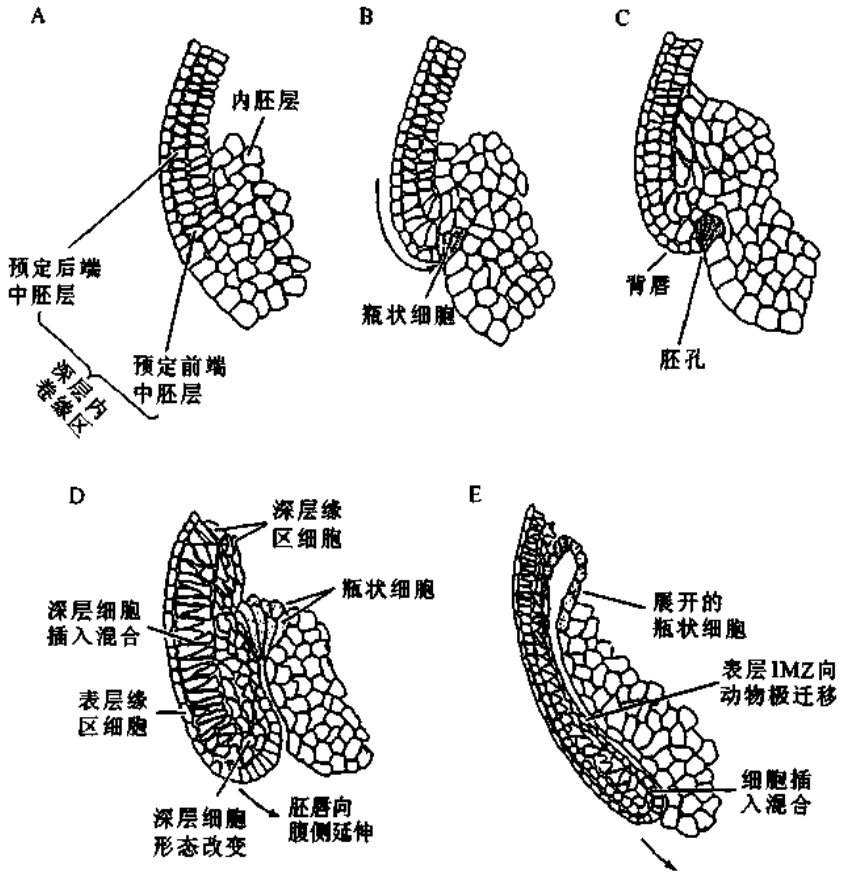


图 4.15 非洲爪蟾早期原肠作用过程中细胞运动模型

A. 原肠作用前内卷的缘区(IMZ)结构。深层 IMZ 由预定前端和后端中胚层构成 B. 瓶状细胞收缩推动预定前端中胚层，并使 IMZ 向外转动 C. 前端中胚层前体拉动中胚层运动进入囊胚腔 D. 深层 IMZ 细胞出现插入混合。中胚层朝动物极运动，牵拉表面细胞和瓶状细胞内卷 E. 随着原肠作用进行，边缘深层细胞变扁平，而以前的表面细胞形成原肠壁

上述细胞运动启动之后，非洲爪蟾的瓶状细胞就不再是必需的了。把瓶状细胞去除后，内卷、胚孔的形成和封闭照样可以进行。细胞向胚胎内运动的主要动力来自缘区表面下方的细胞内卷而不是表面细胞的内卷。缘区表面下方的细胞称为深层内卷缘区细胞(deep involuting marginal zone cell)，它们向内运动，并沿其余深层细胞内表面向动物极迁移，而表面细胞由于和主动迁移的深层细胞相连而迁移进去形成原肠的衬里。瓶状细胞向胚胎更深层运动依赖于它们与其下方的深层细胞之间的接触。去掉瓶状细胞，并不影响深层或表面缘区细胞向胚胎内部卷入，但如果去掉缘区深层细胞，并用动物极细胞补充上去，原肠形成便立即停止。

2. 非洲爪蟾原肠作用期间中胚层的形成

在缘区细胞胚唇内卷前不久，深层由好几层细胞构成的缘区细胞彼此插入混合(intercalation 或 interdigitation)，形成薄而宽的单层细胞(图 4.15)。深层缘区细胞之间的插入混合，使正在内卷的缘区(involuting marginal zone，IMZ)向植物极进一步延伸。与此同时，表面细胞通过分裂(细胞数量增加)和变扁平(细胞形状改变)而扩展。当深层细胞运动到达胚唇时，它们卷入胚胎内部，彼此之间也进行插入混合，且沿中侧轴(mediolateral axis)集中延伸，使数串中胚层细胞并合起来，形成窄而长的中胚层带(mesodermal band)。中胚层带前端向动物极迁移，牵拉附在上面的表面细胞(包括瓶状细胞)向动物极运动，并形成原肠顶壁。由此可见，虽然瓶状细胞负责形成最初的内陷沟，但细胞内卷的动力却来自深层缘区细胞。此外，深层缘区细胞彼此之间相互插入混合负责使中胚层细胞向胚胎内部继续运动。

四、内卷中胚层的迁移

随着中胚层细胞运动的继续进行，集中延伸使得正在内卷的缘区变窄变长。内卷缘区(IMZ)包括最表层的预定原肠顶壁细胞(IMZ_S)和深层的预定脊索中胚层细胞(IMZ_D)。在原肠作用进行到三分之一时，正在扩展的中胚层片层(sheet)向胚胎中线集中。这一过程受细胞沿前后轴彼此不断插入混合所驱动，并使中胚层带进一步变窄。至原肠作用将要结束时，位于中间的脊索与其两侧的体节中胚层分离，细胞独自拉长。中胚层的集中延伸似为一自主过程，因为把中胚层细胞从胚胎中分离出来，它们同样可以集中延伸。

原肠作用期间，动物极极帽(animal cap)和不内卷缘区(NIMZ)细胞通过下包扩展包被整个胚胎。背部区域的 NIMZ 细胞扩展速度比腹部区域的快，使得胚唇向腹部移动。通过背唇进入胚胎内部的中胚层形成背轴中胚层，而通过侧唇和腹唇进入胚胎内部的中胚层则形成中胚层套膜(mesodermal mantle)，将来发育成身体其他部分的中胚层结构，如心脏、肾、血液及骨骼等。内胚层细胞来源于 IMZ_S细胞和胚孔下方植物性细胞(subblastoporal vegetal cell)，后两者分别形成原肠的顶壁和底壁。

五、外胚层的下包

在胚唇内卷的同时，外胚层细胞也在整个胚胎中扩展。用扫描电镜观察动物极区以及缘区的表面细胞和深层细胞的变化，发现非洲爪蟾原肠作用时外包的主要机制是细胞数目的增加(由细胞分裂产生)以及同时发生的由好几层细胞构成的深层细胞合并为单层细胞。在原肠早期，细胞进行 3 次分裂使动物半球的深层细胞数目增加。与此同时，由好几层细胞构成的大量深层细胞完全合并为单层细胞。最表层的细胞通过细胞分裂和自身变扁平而进行扩展。背、腹缘区细胞扩展的机

制可能和动物极细胞相同,只不过细胞形态变化在背、腹缘区细胞扩展中要比在动物极细胞扩展中所起的作用更为突出。扩展的结果使动物极极帽的表层细胞和深层细胞以及非内卷的缘区细胞沿胚胎表面下包。如前所述,大多数的缘区细胞内卷参与形成胚胎内部的中胚层带。

非洲爪蟾的原肠作用是数个独立事件和谐的组合。原肠作用的最初征兆是缘区内胚层瓶状细胞在准确的时间和精确的位置内陷。接着,缘区细胞通过胚唇进行内卷形成原肠,中胚层套膜前沿的内卷细胞沿胚孔顶壁内表面迁移,而位于其后的预定脊索中胚层通过在胚胎背部集中延伸变窄变长。与此同时,预定外胚层细胞通过细胞分裂和数层细胞并合为单层细胞而向植物极下包。上述细胞运动的结果是把内、中、外三个胚层细胞置于适当的位置,为它们分化成不同的器官做准备。

第五节 鸟 类

一、鸟类原肠作用概述

鸟类胚胎经过卵裂在大量的卵黄上形成一个胚盘(blastodisc)。胚盘下方"惰性"的卵黄对上面细胞的运动施以严格限制。初看起来,鸟类原肠作用好像与海胆或两栖类的原肠作用很不相同。实际上,鸟类原肠作用和前面已经介绍过的几种动物的原肠作用极为相似。

1. 下胚层和上胚层的形成

鸟类胚盘中央细胞被胚下腔(subgerminal cavity)和卵黄分开,看起来透明,因此胚盘中央被称为明区(area pellucida)。相比之下,明区边缘细胞由于和卵黄相接触,看起来不透明,因此称为暗区(area opaque)。当大多数细胞仍然维系在表面形成上胚层时,某些细胞单个地迁移到胚下腔中,形成多点内陷小岛(polyinvagination island)即初级下胚层(primary hypoblast)。每个小岛由 5~20 个细胞构成(图 4.16)。此后不久,胚盘后缘有一层细胞向前迁移和多点内陷小岛汇合,形成次级下胚层(secondary hypoblast)。由上胚层和下胚层组成的双层囊胚在暗区边缘连接在一起,两层之间的空间即为囊胚腔。因此,鸟类囊胚结构和两栖类、海胆的并无什么不同。

鸟类胚胎命运图谱局限于上胚层,下胚层对正在发育的胚胎本身没有任何实质性贡献。下胚层细胞只形成部分胚胎外膜(extraembryonic membrane),尤其是卵黄囊(yolk sac)和连接卵黄与消化管的基柄(stalk)。胚胎本身所有三个胚层和大量胚胎外膜都由上胚层所产生。图 4.17 示鸡胚上胚层命运图谱,它是综合数种命运图谱研究结果绘制而成的。活体染色和移植同位素标记细胞在绘制命运图谱大框架方面非常有用,因为这两种方法都能标记一群细胞,且染料和同位素随着发育的进行会扩散。移植具有遗传标记的细胞(如把鹌鹑细胞移植到鸡胚上)虽然解决了扩散问题,但仍然不能跟踪单个细胞发育的命运。最近,用病毒和荧光染料标记使全程跟踪单个细胞发育命运成为可能。由图 4.17 可以看出:当原条(primitive streak)向前迁移时,细胞显著地集中延伸。虽然鸟类原肠胚特定区域细胞倾向于形成特定类型的细胞,但当它们被移植到胚胎另一区域时,仍能发育成不同类型的细胞。

2. 原条的形成

鸟类、爬行类和哺乳类原肠作用的主要特征性结构是原条。原条首先见于胚胎后端上胚层细胞层的加厚处。这种细胞加厚是来自上胚层的中胚层细胞内移进入囊胚腔以及来自上胚层后端两

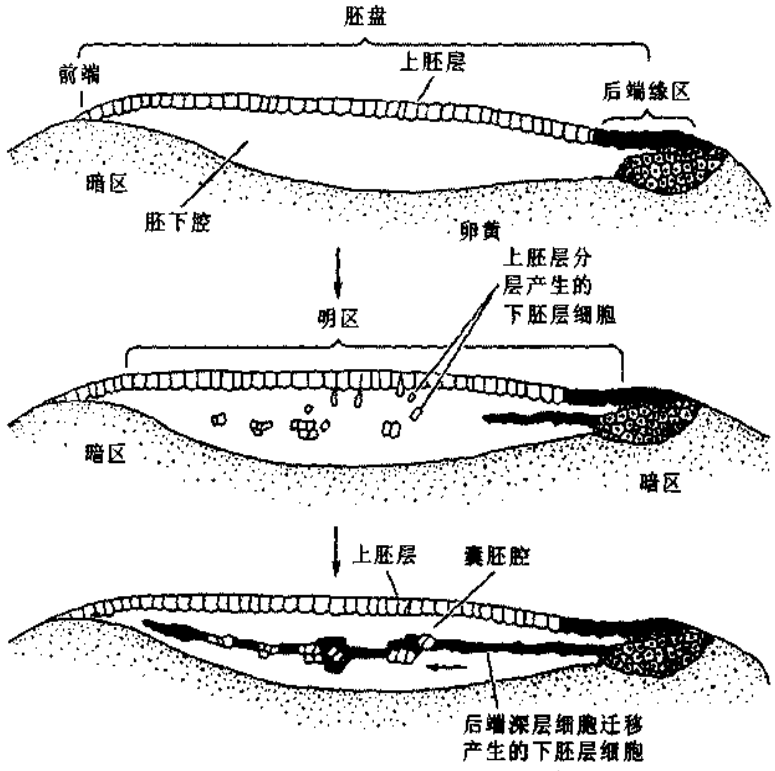


图 4.16 鸡胚双层囊胚的形成

最初的下胚层细胞单个地分层，进入胚下腔形成细胞小岛。来自后缘的细胞形成细胞群，在胚盘下面迁移，与细胞小岛汇合，由此形成的细胞层成为下胚层。下胚层上面的细胞层为上胚层。随着下胚层细胞向前迁移，上胚层细胞在后端聚集，形成原条

侧细胞向中央迁移所致。随着加厚部分不断变窄，它不断向前运动，并收缩形成清晰的原条。原条延伸至明区长度 60%～75%处，并成为胚胎前后轴的标志。伴随着细胞集中形成原条，在原条中出现一凹陷，称为原沟(primtive groove)。原沟与胚孔作用相似，迁移的细胞通过原沟进入囊胚腔。因此，原沟和两栖类的胚孔同源。在原条的前端是一个细胞加厚区叫原结(primitive knot)或亨氏结(Hensen's node)。亨氏结的中央有一个烟囱状的凹陷，叫原窝(primitive pit)。细胞可以通过原窝进入囊胚腔。亨氏结在功能上相当于两栖类胚孔的背唇。

原条一经形成，上胚层细胞便开始向原条边缘迁移，进入囊胚腔内(图 4.18)。像两栖类的胚孔一样，原条的细胞组成也连续不断地变化。通过亨氏结进入囊胚腔的细胞向前端迁移，形成前肠、头部中胚层和脊索；通过原条两侧部分进入囊胚腔的细胞形成大部分内胚层和中胚层组织。与非洲爪蟾中胚层以细胞层的形式迁移进入囊胚腔不同，进入鸟类囊胚腔的细胞以单个细胞为单位。因此，内移的细胞并不形成紧密联系的细胞层，而只形成松散联系的间质细胞。不仅如此，鸟类原肠胚中并不产生真正的原肠。

随着细胞进入原条，原条向胚胎未来头部区域延长。同时，次级下胚层细胞从胚盘后缘向前移动。原条的延长与次级下胚层细胞向前端移动可能同时进行。

3. 通过原条的细胞迁移：内胚层和中胚层的形成

最早通过原条迁移的细胞是预定发育成前肠的细胞，这一点又与在两栖类中看到的情形相似。

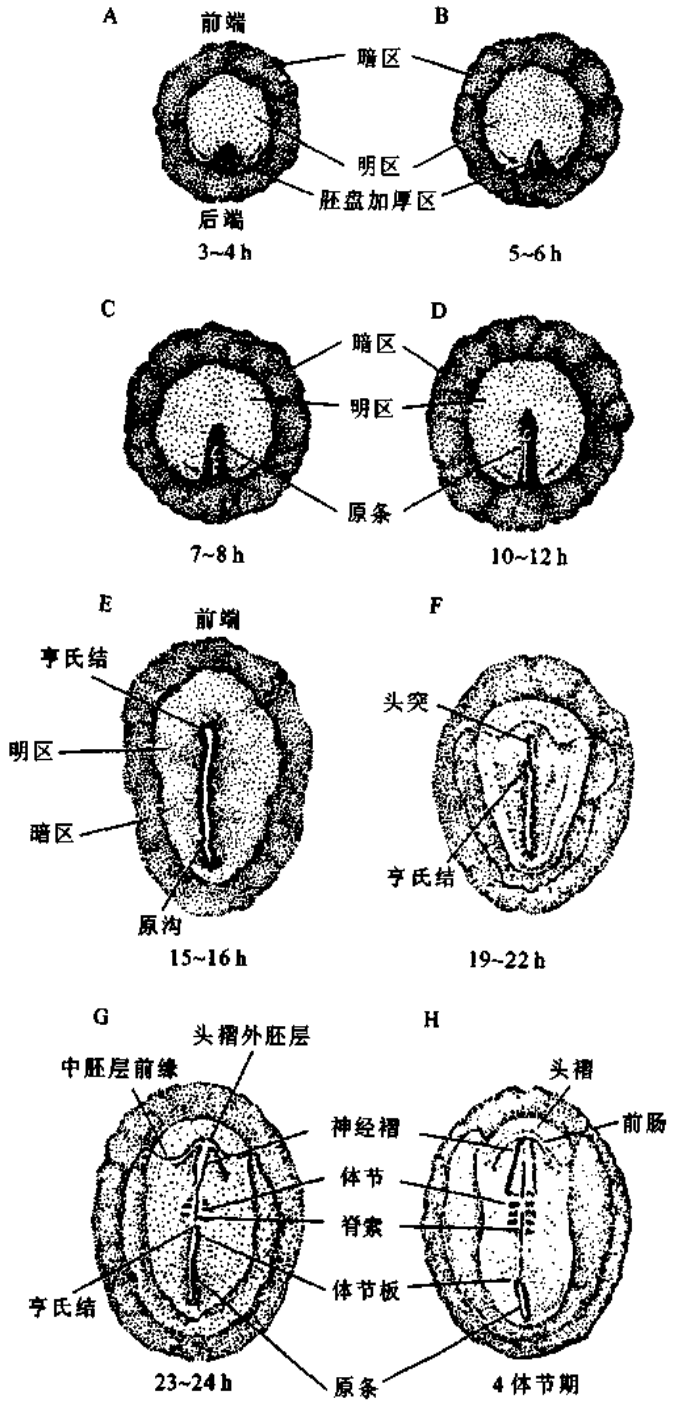


图 4.17 鸡胚原条细胞的运动

A~E. 原条形成和伸长背面观 - 箭头示上胚层 HNK - 1 阳性细胞的早期运动 F~H. 伴随原条回缩,脊索和体节逐渐形成

这些细胞一旦进入囊胚腔,就向前迁移,最后把胚胎前区的下胚层细胞挤走,使下胚层细胞局限于明区前部的一个区域里。下胚层细胞构成的区域即生殖新月(germinal crescent)不形成任何胚胎

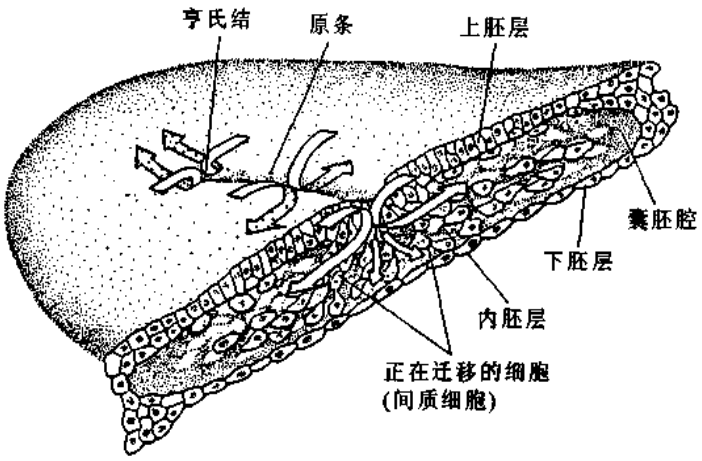


图 4.18 鸡胚原肠作用立体图解

示原条、正在迁移的细胞和原有两胚层之间的关系。下面细胞层成为下胚层和内胚层细胞的嵌合体，但下胚层细胞最终分离出来在内胚层下方形成一细胞层，参与卵黄囊的形成

本身结构，但它含有生殖细胞前体，以后通过血管迁移到生殖腺中。接着通过亨氏结进入囊胚腔的细胞也向前迁移，但它们不似前肠内胚层细胞那样迁移深及腹部，而是保持在内胚层和上胚层之间，将来形成头部中胚层和脊索中胚层细胞。上述内移的细胞全都向前运动，向上推举上胚层前端中线区域，形成头突(head process)。同时，细胞通过原条两侧继续向内迁移。通过原条两侧进入囊胚腔的细胞，分成两部分：一部分细胞向更深层迁移，将下胚层中线处的细胞挤走，并取而代之；另一部分细胞在整个囊胚腔中扩散，大致在上、下胚层之间的中间位置形成松散的细胞层。向更深层迁移的细胞发育成胚胎内胚层器官以及大部分胚胎外膜，而扩散到整个囊胚腔的细胞则发育成胚胎中胚层部分和胚胎外膜。

随后，原肠作用进入一个新时期。在中胚层细胞继续内移的同时，原条开始回缩，使大致位于明区中央的亨氏结向后推移。在原条回缩留下的痕迹上出现了胚胎背轴和头突。随着亨氏结继续向后回缩，脊索后端部分开始形成。最终，亨氏结回缩到最后端区域，将来形成肛门。至此，上胚层完全由预定外胚层构成。鸡胚孵育 22 h 后，尽管预定中胚层细胞还要继续向内迁移很长时间，但是，大部分预定内胚层细胞已经进入胚胎内部。

经上述两步原肠作用后，鸟类(还有哺乳类)胚胎呈现出一个明显的发育成熟度(developmental maturity)前后梯度：当胚胎后部细胞还在进行原肠作用时，前端的细胞已经开始形成器官了。随后数天内，胚胎前端比后端发育更为提前。

当预定中胚层和内胚层细胞向囊胚腔内运动时，预定外胚层细胞还在分裂，并成为胚胎最上层唯一的细胞群。不仅如此，预定外胚层细胞迁移离开胚盘，通过下包包被卵黄。外胚层包被卵黄是一项费力的事，鸡胚大约需要花 4 天多时间才能完成，其间包括连续不断地产生新细胞以及预定外胚层细胞沿卵黄膜下方迁移。因此，鸟类原肠作用结束时，外胚层已将卵黄包被起来，内胚层已经取代了下胚层，而中胚层则已迁移到内外两胚层之间。

二、鸟类原肠作用机制

1. 下胚层的作用和胚轴的形成

背腹轴对于下胚层的形成和胚胎的进一步发育至关重要。当胚盘的分裂球在胚盘上部的碱性清蛋白(pH=9.5)与下部的酸性胚下腔(pH=6.5)之间建立起一层屏障时，背腹轴也就建立起来了。清蛋白中的水和钠离子通过细胞被转运到胚下腔，于是形成了一个 25 mV 跨细胞层的膜电位(细胞的腹部为阳极)。这样，细胞形成了两个不同的面：一面面对带负电的碱性清蛋白，另一面面对带正电的酸性胚下腔液。细胞面对清蛋白的一面形成背部，而面对胚下腔的一面形成腹部。这种背腹部关系可以通过改变细胞两面的 pH 梯度或改变跨细胞层的电位而发生逆转。

从辐射对称的囊胚转换为两侧对称的结构是依靠重力来决定的。当卵子由输卵管内排出时，它以每小时 10～15 转的速度旋转。在卵子旋转时，将来形成细胞层的细胞质总是朝向下方，其上方却受到致密卵黄的挤压。因此，将来形成细胞层的细胞质并不位于卵黄正上方，而是稍稍偏向一侧。胚盘最突出(最高)部分将来形成囊胚尾端，即原肠作用起始处。由此可见，前后轴和背腹轴早在原肠作用之前当卵子由输卵管排出时就已经决定了。

鸡囊胚是一个整体协调的系统。如果把鸡囊胚分成几部分，每一部分只要有自己的边缘区域，都能形成自己的胚胎。鸡囊胚这种整体协调的能力似乎存在于后端缘区即开始形成下胚层的区域。后端缘区细胞不仅能产生下胚层诱导原条形成的细胞，而且能阻止其他缘区诱导形成自己的下胚层。Khaner 和 Eyal－Giladi(1989)发现，把后端缘区移植到同一胚胎的侧面缘区，后端伤口愈合，胚胎出现两个原条。同样地，如果把后端缘区和侧面缘区互换移植，那么，只能在移植到侧面缘区的原后端缘区上形成一个原条。不过，如果把后端缘区移植到另一个保留有自己后端缘区的胚胎上，则只有受体胚胎原有的后端缘区形成下胚层，位于原条下方。Khaner 和 Eyal－Giladi 认为，鸡胚边缘区域细胞形成一个“活性梯度”(gradient of activity)，即边缘区域细胞活性有大小之分，活性最大部分位于鸡胚后端；后端细胞形成下胚层，同时能阻止其他活性较小的细胞形成自己的下胚层。

2. 原条细胞的聚集

正如人们早就推测的那样，上胚层不是一个均匀的未分化组织。早在原条开始形成之前，上胚层细胞就出现了分化：某些在整个上胚层中随机分布的细胞与其他细胞不同，表面具有一种特异性分子——硫酸化葡糖醛酸(glucuronic acid，HNK－1)。呈 HNK－1 阳性的细胞单个内移到囊胚腔，并向后端迁移。后端缘区组织很可能分泌一种化学物质，吸引 HNK－1 阳性细胞，而前端缘区组织则分泌一种“排斥”分子(repellent molecule)，因而不能吸引 HNK－1 阳性细胞。聚集到后端缘区的 HNK－1 阳性细胞将形成内胚层和中胚层，而 HNK－1 阴性细胞将形成外胚层。如果用抗体选择性地毁掉 HNK－1 阳性细胞，它们将仍停留在上胚层中，胚胎也不形成任何中胚层和内胚层。HNK－1 阳性细胞和上面的上胚层细胞互相作用，形成原条原基。原条原基通过细胞集中延伸而变窄拉长。当原条即将延伸到其最大长度时，HNK－1 阳性细胞把上胚层中部的基质片层溶解掉，形成原沟。这使上胚层中 HNK－1 阴性细胞向前延伸时充实到原条中，并与 HNK－1 阳性细胞一起参与胚胎中胚层和内胚层的形成。

羊膜动物囊胚腔内的细胞运动是单个细胞行为，而非细胞层行为。但是，如同两栖类原肠作用一样，鸟类胚胎中横跨胚孔的细胞顶端也收缩，变成瓶状细胞。在原沟前端亨氏结处，基质片层的溶解和上胚层细胞的游离是由分散因子(scatter factor)来完成的。分散因子是一种相对分子质量为 1.9×10^5 的蛋白，它只在亨氏结中分泌，其作用相当复杂：既能使亨氏结区域细胞分散，又能诱导亨氏结附近的上胚层形成神经组织。当含有分散因子的树脂植入鸡早期原肠胚上胚层下方时，

可以诱导形成新的原条。分散因子和毗邻细胞上的受体——酪氨酸激酶结合，通过 G 蛋白级联反应发生作用，使把 E－细胞选择蛋白(E－cadherin)锚定在细胞膜上的 β－连环蛋白(β－catenin)磷酸化。缺乏正常功能的 E－细胞选择蛋白时，该区域的表层细胞就分散开来，成为间质细胞。细胞一旦从原条游离出来，进入囊胚腔，就变扁变平，成为一排彼此独立迁移的细胞的一部分。胞外多糖如透明质酸也可能在这一迁移过程中起重要作用。透明质酸由外胚层细胞产生，在囊胚腔内积累。透明质酸能将进入囊胚腔的细胞表面包裹起来。如果把透明质酸酶注射到囊胚腔，将透明质酸降解掉，间质细胞便集结成团，不能正常迁移。大量研究表明，透明质酸最初积累时间正好和第一批细胞进入囊胚腔的时间吻合；透明质酸能使正在迁移的间质细胞处于彼此分离状态。透明质酸还可能通过它在水中膨胀的能力保持细胞彼此分离。在水中，透明质酸可以膨胀至原有体积 1 000 倍以上。因此，透明质酸可能是保持间质细胞在迁移过程中处于分散状态并保障迁移不断继续的重要因子。

透明质酸和其他多糖能促进单个细胞迁移，但它们并不能驱动细胞迁移。相反，细胞的迁移和上胚层胞外基质片层中的纤连蛋白网有关。在原条形成前不久，富含纤连蛋白的网络层在预定原条区域消失，而在上胚层下表面(undersurface)出现。在原条内，细胞分散开来，沿上胚层富含纤连蛋白的基膜侧向迁移。不过，并无明显证据表明纤连蛋白是细胞从原条向两侧定向运动所不可或缺的。

3．脊索的二次形成

鸟类前部脊索由通过亨氏结内移的细胞向前迁移而形成，但后端脊索的形成方式则不相同。鸡胚第 17 体节后面的脊索是由通过原条内移的中胚层细胞聚集而成。后部脊索向后延伸，形成胚胎 28～50 体节的“尾芽”。

4．外胚层的外包

原肠作用期间，外胚层细胞向外扩展包被卵黄。外胚层细胞通过紧密连接彼此联系在一起，因而迁移时作为一个整体而非单个细胞运动。在鸟类，暗区细胞上表面和卵黄膜下表面紧紧相连，暗区细胞能沿卵黄膜下表面扩展。体外培养外胚层细胞具有同样表现。离体的胚盘放在分离下来的卵黄膜上，能正常扩展。这种扩展只能在卵黄膜上进行，在其他表面上不会发生。这表明，卵黄膜是外胚层细胞扩展不可或缺的。有趣的是，只有缘区细胞(也就是暗区细胞)和卵黄膜紧紧相连，其他多数胚盘细胞即使和卵黄膜相连，连接也很松散。缘区细胞的属性和其他细胞的不同，它们可以向卵黄膜上伸出大量胞质突起即线状伪足(500 μm)，这些线状伪足被认为是缘区细胞的运动胞器。

有证据表明，缘区(暗区)细胞是外胚层下包的动因。首先，胚盘只有在缘区扩展时才扩展；如果去掉缘区细胞，外胚层下包即告停止。其次，当把缘区细胞和其他细胞联系切断时，缘区细胞可以继续单独迁移。因此，外胚层细胞受缘区主动迁移细胞的牵拉而下包。缘区细胞的细胞膜和卵黄膜下表面之间也存在特殊关系。当胚盘上下表面颠倒过来放在卵黄膜上，即胚盘深层(而非上层)和卵黄膜接触时，胚盘边缘向内卷起，以便缘区细胞的上层表面能重新与卵黄膜接触(图 4.19)。Lash 等(1990)证明，纤连蛋白存在于卵黄膜的内表面上。当胚盘细胞在卵黄膜上迁移时，如果把合成的纤连蛋白附着位点序列(fribronectin－attachment－site sequence)Arg－Gly－Asp(RGD)放到卵黄膜上，它就会特异性地破坏缘区细胞和卵黄膜之间的接触，导致缘区细胞伸出的线状伪足缩回，胚盘细胞停止迁移。

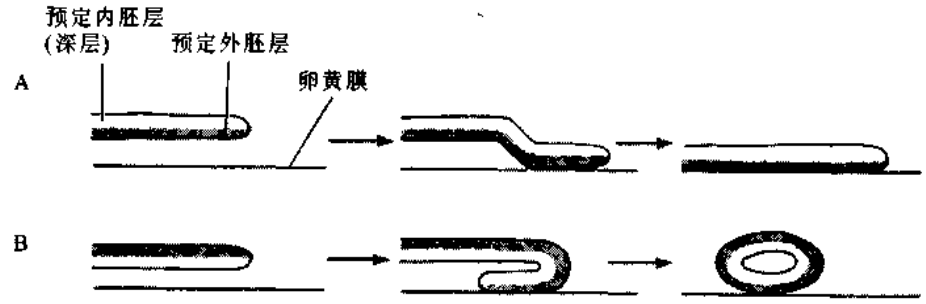


图 4.19 鸡胚外胚层迁移属性

A. 把鸡胚盘放到卵黄膜上，使外胚层细胞和卵黄膜表面接触，缘区细胞就会沿卵黄膜表面迁移，外胚层细胞把卵黄膜覆盖起来 B. 把鸡胚盘深层细胞放到卵黄膜上，胚盘细胞层就会卷曲，使表层细胞和卵黄膜相接触，并在卵黄膜上迁移，其结果形成一个封闭囊泡

鸟类原肠作用的许多过程已经搞清楚，但这些过程发生的机制所知甚少。例如，胚下腔是如何形成的？某些细胞是如何特化成为下胚层细胞的？为何有些细胞表达 HNK－1 而其邻近的细胞不表达？HNK－1 阳性细胞是如何迁移到后端，又如何在那里和上胚层细胞相互作用的？原条是如何延伸，又如何回缩，即原条细胞预定命运是如何特化的等等。其实，虽然对鸟类原肠作用和神经胚形成每一过程都有文字描述，但可以毫不夸张地说，我们对其所知远少于未知。

第六节 哺 乳 类

鸟类和哺乳类都是由爬行类演化而来，因此，哺乳类发育模式和鸟类以及爬行类相似不足为奇。令人惊奇的是，哺乳类卵子为少黄卵，但其胚胎仍保留着为适应多黄卵而进化形成的鸟类和爬行类胚胎的原肠作用运动方式。哺乳类的内细胞团可以看作是坐落在想象的卵黄球顶部的胚盘，它按照与其祖先爬行类相似的模式发育。

一、体内发育带来的变化

大多数哺乳动物演化出一种非同寻常的策略：胚胎在母体内发育，而不是离体的卵子发育。哺乳类胚胎直接从母体获取营养，而不是从卵子所贮备的卵黄获取营养。哺乳动物的这一进化导致母体解剖结构发生巨大变化（如输卵管膨大形成子宫）以及专司吸收母体营养的胎儿器官的出现。专司吸收母体营养的胎儿器官即胎盘（placenta），主要由胚胎滋养层细胞（trophoblast cell）和内细胞团形成的中胚层细胞发育而来。

图 4.20 示哺乳类组织的早期起源。内细胞团内最早的细胞隔离是下胚层（有时称为原始内胚层）的形成。下胚层细胞由内细胞团分离出来，排列在囊胚腔周围，形成卵黄囊内胚层（yolk sac endoderm）。如同在鸟类胚胎中一样，卵黄囊内胚层细胞不参与形成新生机体的任何组织。位于下胚层之上的内细胞团称为上胚层。上胚层细胞被缝隙（cleft）隔开；缝隙最后连接起来，把胚胎上胚层和形成羊膜腔壁的上胚层隔开（图 4.21 和 4.22）。羊膜腔一旦形成，内部便充满称为羊水（amniotic fluid）的分泌物。羊水可以防止失水，减缓冲撞，保护胎儿。

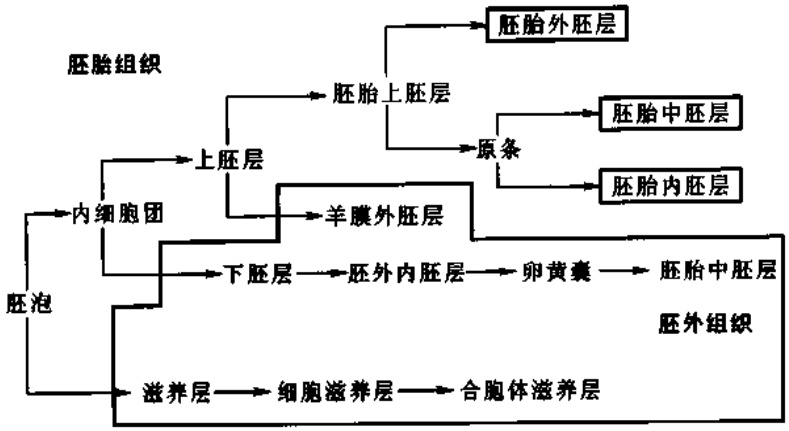


图 4.20 人类和猕猴胚胎组织衍生物示意图

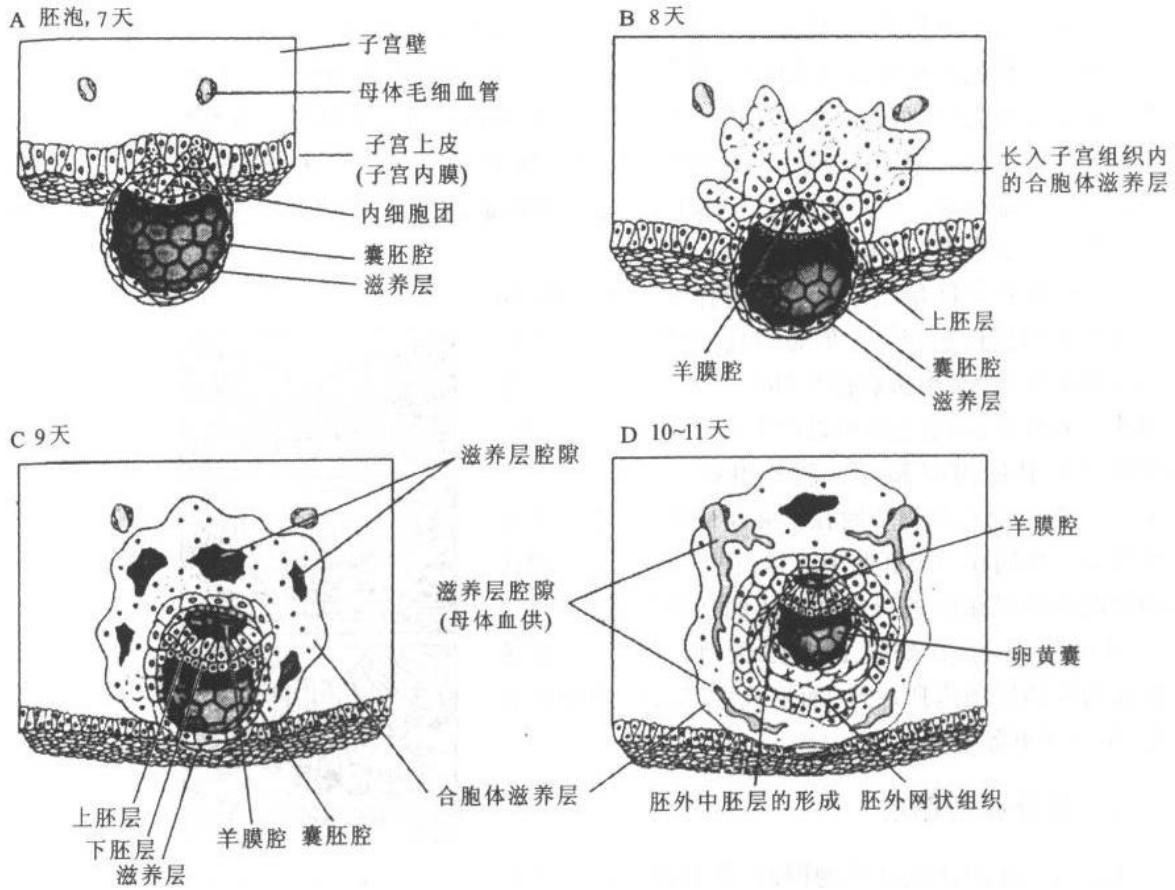


图 4.21 7至11天人类胚胎的组织形成

A、B. 原肠作用前的胚泡。内细胞团把下胚层细胞沿滋养层分层,形成原始的卵黄囊和与鸟类胚胎相似的双层胚盘。在某些哺乳类中,滋养层可能分成覆盖内细胞团的极性滋养层和不覆盖内细胞团的壁滋养层。滋养层细胞分裂形成细胞滋养层和合胞体滋养层。细胞滋养层形成绒毛;合胞体滋养层融入子宫组织 C. 上胚层分裂形成羊膜外胚层(包绕羊膜腔)和胚体上胚层。哺乳类成体即由胚体上胚层细胞形成 D. 胚外内胚层形成卵黄囊

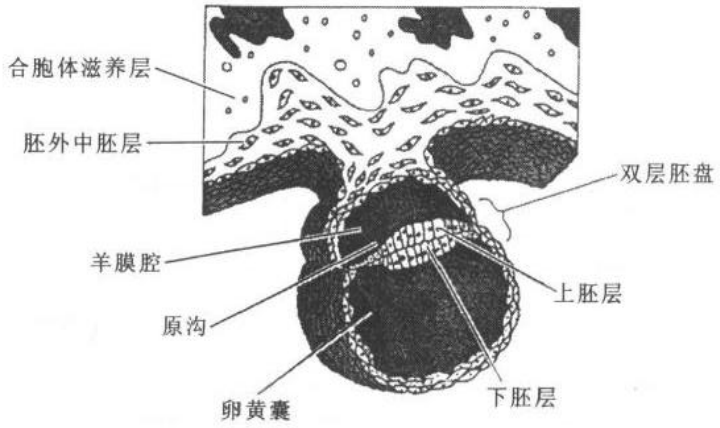


图 4.22 人妊娠 15 天胚胎和子宫之间的联系

哺乳类胚胎上胚层包含所有形成胚胎本身的细胞，它在许多方面和鸟类上胚层相似。用辣根过氧化物酶标记单个细胞，已建立起小鼠上胚层详细的发育命运图谱。和鸡胚一样，哺乳动物的中胚层和内胚层细胞同样通过原条迁移，当它们进入原条时，上胚层细胞停止表达将细胞凝集在一起的 E－细胞选择蛋白，并各自独立迁移。哺乳动物脊索也由通过亨氏结迁移的细胞形成，但脊索形成方式和鸟类不同。例如，形成小鼠脊索的细胞整合到原肠内胚层中，这些细胞构成一条从亨氏结向吻端延伸的细胞带。该细胞带由小而具纤毛的细胞组成，它们向中线处集中，再从原肠顶壁向背部隆起折叠形成脊索(图 4.23)。

哺乳类胚胎外胚层位于已充分延伸的原条前端，和鸡胚中的外胚层位置相似。但是，鸡胚中胚层由原条最后端的细胞形成，而小鼠胚胎中胚层则由原条前端的细胞形成。有时候，细胞克隆可以产生不止一种胚层组织，或者既产生胚胎组织又产生胚外组织(extraembryonic tissue)。因此，哺乳动物胚胎在上胚层时期，细胞系尚未彼此分离。如同在鸟类胚胎中一样，在上、下胚层之间迁移的细胞被最早在原条形成时合成的透明质酸所包裹。Larsen(1993)认为，在妊娠 14～15 天时，下胚层细胞被迁移来的内胚层细胞所取代，而形成中胚层的细胞直到妊娠 16 天才开始迁移。

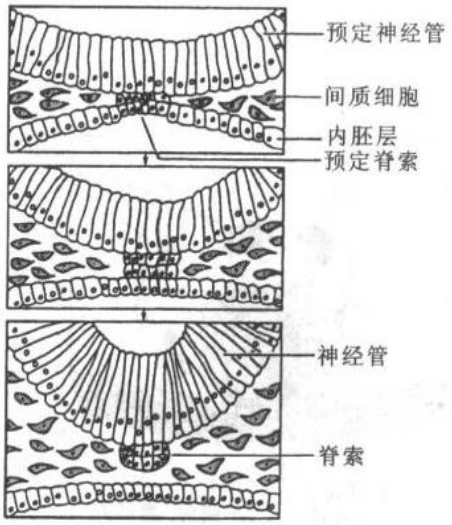


图 4.23 小鼠脊索的形成
小而具纤毛的细胞向背部折叠形成脊索

二、胚外膜的形成

在胚胎上胚层细胞迁移的同时，胚外细胞则正在形成使胎儿在母体内生存的哺乳类独特的组织。小鼠和人最早的滋养层细胞看起来很正常，但它们分裂时只发生核分裂，细胞质不分裂，因而形成多核细胞。最早的滋养层细胞构成细胞滋养层(cytotrophoblast)，而多核细胞则构成合胞体滋养层(syncytiotrophoblast)。细胞滋养层通过一系列粘着分子附着到子宫壁即子宫内膜(endometrium)上。人的细胞滋养层细胞含有蛋白水解酶，能使滋养层细胞进入子

宫，并重塑子宫血管，使胎儿血管浸泡在母体血管中。合胞体滋养层组织使胚胎和子宫联系更进一步。细胞滋养层的水解酶活性在妊娠 12 周后消失。接着，子宫向合胞体滋养层发出血管，并最终与合胞体滋养层接触。此后不久，原肠胚的中胚层组织向外扩展。最近对人和猕猴胚胎的研究结果表明，胚外中胚层来源于卵黄囊。胚外中胚层和滋养层上的突起相连接，产生血管，把营养由母体输送给胎儿。胚胎和滋养层相连的胚外中胚层狭窄的基柄最终形成脐带(umbilical cord)。合胞体滋养层充分发育后，形成由滋养层组织和富含血管的中胚层构成的器官——绒毛膜(chorion)。绒毛膜和子宫壁融合形成胎盘。因此，胎盘既含有母体成分(子宫内壁)，又含有胎儿成分(绒毛膜)。绒毛膜和母体组织有时候可能紧密接触，但很容易分开，如猪的紧密胎盘(contact placenta)；有时候两者也可能紧密连接，以至于不损伤母体和胎儿不能将两者分开，如包括人在内的多数哺乳类的脱落胎盘(deciduous placenta)。

在人 6 周胚胎中，很容易看到从绒毛膜外表面伸出许多微绒毛，其中包含进、出绒毛膜的血管。从绒毛膜外表面伸出的微绒毛不但含有血管，而且扩大了绒毛膜和母体血管接触的面积。因此，虽然胎儿和母体血液循环系统一般并不汇合，但是可溶性物质很容易通过微绒毛扩散(图 4.24)。正是通过这种扩散方式，母体给胎儿提供营养和氧气，而胎儿把代谢废物(主要是 CO_2 和尿素)排入母体循环系统。绒毛膜的微绒毛血管由进入细胞滋养层组织凸起(称为初级微绒毛，primary villi)的胚外中胚层形成。当胚外中胚层细胞进入细胞滋养层组织凸起后即形成次级微绒毛(secondary villi)，这在妊娠第 2 周发生。至妊娠第 3 周末，部分胚外中胚层已形成血管，于是次级微绒毛变成三级微绒毛(tertiary villi)。营养和氧气由母体输送给胎儿就是通过三级微绒毛进行的。

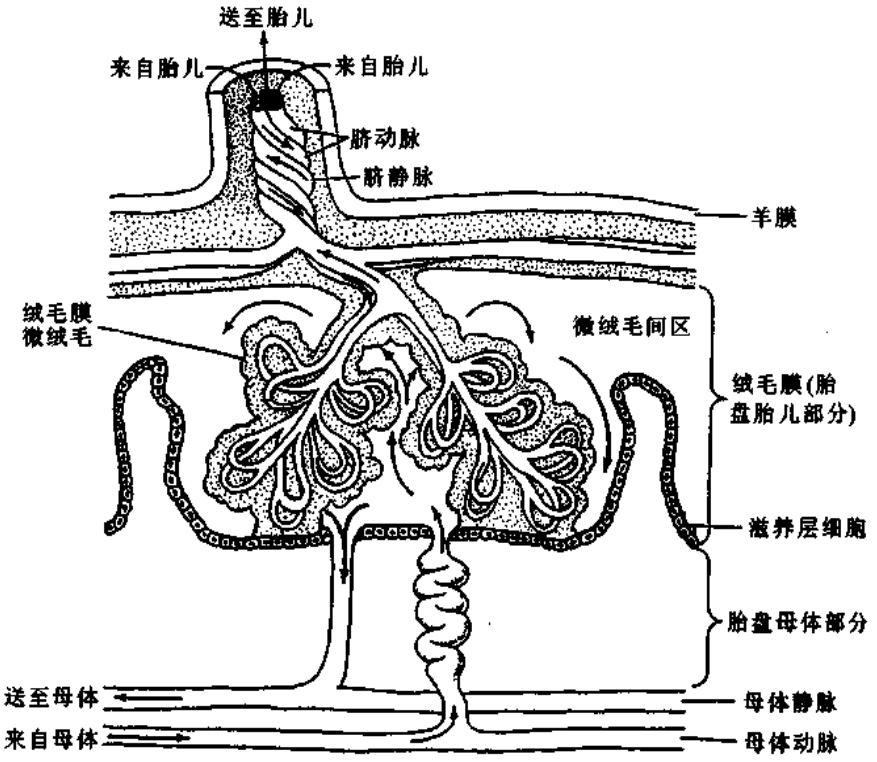


图 4.24 绒毛膜微绒毛和母体子宫血管之间的关系

不难看出，滋养层对于贴附于和进入子宫的组织十分重要，而绒毛膜则使母体和胎儿之间能进行气体和营养交换。绒毛膜的合胞体滋养层部分可产生 3 种激素，均为哺乳类胚胎发育所不可或缺：① 绒毛膜促性腺激素(chorionic gonadotropin)，它是一种多肽类激素，可以使胎盘(及母体卵巢)细胞产生孕酮(progesterone)。② 孕酮，它是一种类固醇激素，能使子宫壁增厚并布满血管。对于灵长类来说，在妊娠过程进行到三分之一时，切除卵巢对正在发育的胚胎不会造成任何损伤，因为绒毛膜自身能产生维持妊娠所必需的固醇类激素。胎盘产生的孕酮也是胎儿肾上腺合成具有重要生物功能的皮质类固醇的底物。③ 绒毛膜催乳激素(chorionic somatomammotropin)，通常称为胎盘催乳素(placental lactogen)，它能促进妊娠期间母体乳房发育以及产后生乳。

新近研究表明，绒毛膜还有保护胎儿免受母体免疫系统伤害的功能。正常人的免疫系统能够认出并排斥进入体内的异源细胞，这可以通过不同遗传性状的个体之间进行器官和皮肤移植时出现的排斥反应得到证实。控制这一排异反应的糖蛋白叫组织相容性抗原(histocompatibility antigen)。每个人的组织相容性抗原都不同于其他人。小孩既表达母亲的组织相容性抗原，也表达父亲的组织相容性抗原。因此，母亲排斥自己孩子的皮肤或器官，因为他含有父亲的组织相容性抗原。那么，人类胎儿是如何在母体内存活九个月的？为什么母亲的免疫系统不像排斥来自孩子的器官那样排斥胎儿？据认为，绒毛膜在抑制排斥胎儿的免疫反应中起重要作用。绒毛膜不但能分泌阻止抗原产生的可溶性蛋白，而且能促进抑制子宫内正常免疫反应的淋巴细胞的产生。细胞滋养层细胞也包含一种胎盘特有的组织相容性抗原，可以保护胚胎不被母体的免疫系统认出。因此，胎盘不仅起物理上的支撑和营养交换作用，而且参与母体和胎儿之间的内分泌和免疫调控。

在原肠作用中，我们看到了一系列令人惊奇的密切协调的细胞运动，由此使卵裂阶段产生的裂球重新排列，并与其毗邻的新细胞发生相互作用。尽管海胆、两栖类、鸟类和哺乳类胚胎的原肠作用有所不同，但是它们具有共同的原肠作用机制。每种动物都面临同样的问题，也就是使预定内胚层和中胚层的细胞迁移到胚胎内部，而预定外胚层细胞包被在胚胎外表面。虽然每种动物卵子的卵黄数量、分布及发育条件各不相同，但都进化出一种机制，保证达到上述目标。

参考文献

1 Berg L K, *et al*. An extracellular matrix molecule that is selectively expressed during development is important for gastrulation in the sea urchin embryo. Development, 1996, 122: 703～713

2 Black S D, Gerhart J. Experimental control of the site of embryonic axis formation in *Xenopus laevis* eggs centrifuged before first cleavage. Dev. Biol., 1985, 108: 310～324

3 Eyal－Giladi H, *et al*. The posterior section of the chick's area pellucida and its involvement in hypoblast and primitive streak formation. Development, 1992, 116: 819～830

4 Fink R D, McClay D R. Three cell recognition changes accompany the ingression of sea urchin primary mesenchyme cells. Dev. Biol., 1985, 107: 66～74

5 Gustafson T, Wolpert L. Cellular movement and contact in sea urchin morphogenesis. Biol. Rev., 1967, 42: 442～498

6 Hardin J D, Keller R. The behaviour and function of bottle cells during gastrulation of *Xenopus laevis*. Development, 1988, 103: 211～230

7 Holtfreter J. A study of the mechanics of gastrulation: Part Ⅱ. J. Exp. Zool.,1944, 95: 171~212

8 Khaner O, Eyal-Giladi H. The chick's marginal zone and primitive streak formation. Ⅰ. Coordinative effect of induction and inhibition. Dev. Boil.,1989, 134: 206~214

9 Larsen W J. Human Embryology. New York:Churchill Livingston, 1993

10 Lash J W, *et al*. Migration of chick blastoderm under the vitelline membrane: The role of fibronectin. Dev. Boil., 1990,139: 407~416

11 Le Douarin, *et al*. Patterning of the neural primordium in the avian embryo. Semin. Dev. Biol.,1996, 7: 157~167

12 Pazmany L, *et al*. Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLA-G expression on target cells. Science,1996, 274: 792~795

13 Psychoyos D, Stern C D. Fates and migratory routes of primitive streak cells in the chick embryo. Development, 1996,122: 1523~1534

14 Solnica-Krezel L, Driever W. Microtubule arrays of the zebrafish yolk cell: organization and function during epiboly. Development, 1994,120: 2443~2455

15 Stern C D, Canning D R. Gastrulation in birds: A model system for the study of animal morphogenesis. Experientia, 1988, 44: 651~657

16 Trinkaus J P. The midblastula transition, the YSL transition, and the onset of gastrulation in *Fundulus*. Development (Suppl.), 1992,92: 75~80

17 Trinkaus J P. Ingression during early gastrulation of *Fundulus*. Dev. Biol.1996, 177: 356~370

18 Warga R M, Kimmel C B. Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. Development, 1990, 108: 569~580

19 Zhang S C *et al*. Topographic changes in nascent and early mesoderm in amphioxus embryos studied by DiI labeling and *in situ* hybridization for a *Brachyury* gene. Dev. Genes Evol., 1997,206: 532~535

第五章　脊椎动物的早期发育

1882 年，当时的胚胎学家(Von Baer)对鸡胚发育进行了详细研究，并通过将鸡胚与其他脊椎动物胚胎比较，总结出了四条规律，即 Von Baer 定律(图 5.1)。

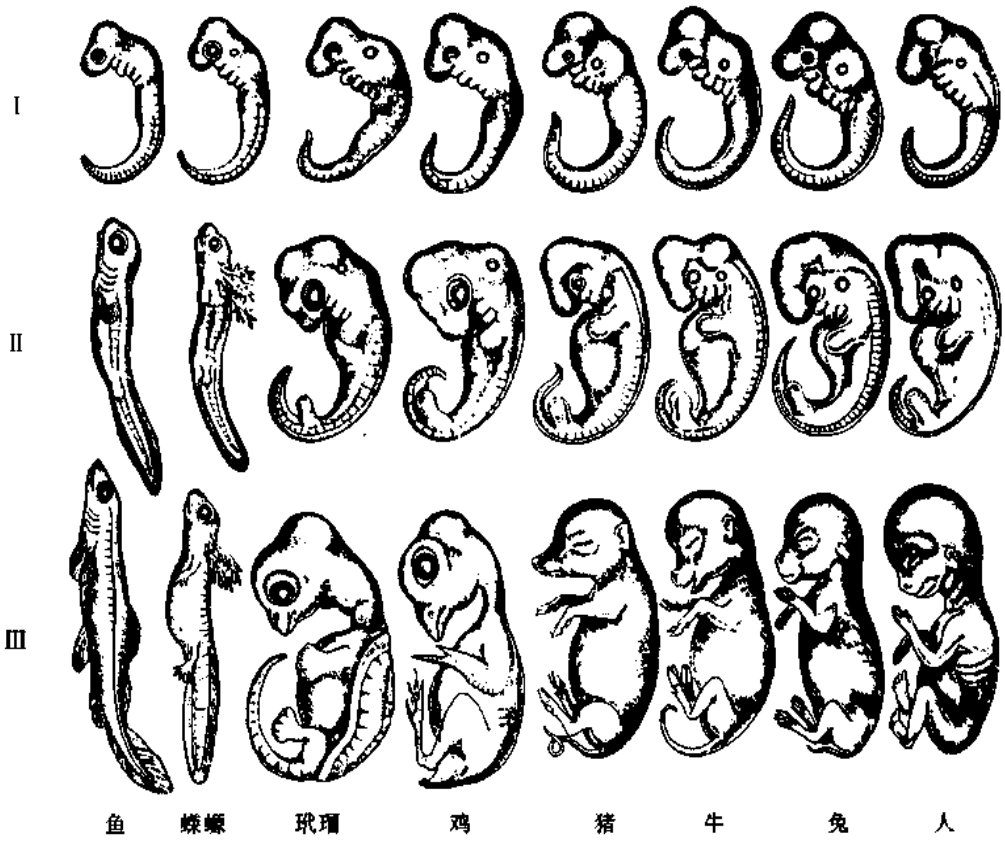


图 5.1　Baer 定律

脊椎动物早期胚胎先形成亚门共有特征。随着发育进行，胚胎逐渐出现纲、目和科的特征，最终出现种的特征

(1) 在胚胎中，动物的一般特征比特化特征出现早。所有正在发育的脊椎动物(鱼类、两栖类、爬行类、鸟类和哺乳类)原肠作用后不久看起来即非常相似：都有鳃裂、脊索、脊髓和原肾，纲、目和种的特征在后期发育中才出现。

(2) 一般特征发育成较特化特征，而较特化特征最后发育成完全特化的特征。所有脊椎动物开始都有同样类型的皮肤，只是到后来皮肤才发育成鱼类和爬行类的鳞，鸟类的羽毛及哺乳类的毛发、爪和指甲。与此相似，所有脊椎动物附肢的早期发育在本质上也是相同的，只是后来才出现腿、翅和臂的分化。

(3) 给定物种的每个胚胎,并不历经其他动物的成年期特征,而是逐渐远离这些动物的成年期特征。鸟类和哺乳类胚胎期鳃裂与鱼类成体鳃裂细节上并不相同,而与鱼类和其他脊椎动物的胚胎鳃裂相似。鱼类把胚胎期鳃裂保存下来,并进一步完善成成体真正的鳃裂,而哺乳类将胚胎期鳃裂转变成耳和口之间的咽鼓管等结构。

(4) 高等动物的早期胚胎从来都不像低等动物的成体,而只与其早期胚胎相似。

Von Baer 观察到不同动物在早期胚胎发育中享有一些共同特征。随着发育的进行,共有的特征变得越来越具有种的特异性。人的胚胎从不经历一个与鱼类或鸟类成体等同的时期,但人的胚胎开始时与鱼类和鸟类的胚胎享有共同的特征。之后,哺乳类与其他动物胚胎向不同方向发展,没有一种哺乳动物的发育要经历鱼类和鸟类的成体时期。

Von Baer 还认识到,所有脊椎动物的发育都存在一个共同的模式:三胚层形成动物不同的器官。三胚层所形成的器官衍生物是恒定不变的。外胚层形成皮肤和神经;内胚层形成呼吸道和消化管;中胚层形成结缔组织、血细胞、心脏、泌尿生殖系统以及大部分内脏器官。本章主要介绍脊椎动物外胚层、内胚层和中胚层器官的早期发育。

第一节　神经胚形成概述

一、中枢神经系统的形成

胚胎形成中枢神经系统原基即神经管的作用称为神经胚形成(neurulation),而正在进行神经管形成的胚胎称为神经胚(neurula)。神经胚形成主要有两种方式:初级神经胚形成(primary neurulation)和次级神经胚形成(secondary neurulation)。初级神经胚形成是指由脊索中胚层诱导覆盖于上面的外胚层细胞分裂、内陷并与表皮层脱离形成中空的神经管。而次级神经胚形成是指外胚层细胞下陷进入胚胎形成实心细胞索,接着再产生空洞形成中空的神经管。胚胎在多大程度上依赖于上述神经管构建方式取决于脊椎动物的种类。鱼类神经胚形成属完全次级型,而鸟类前端部分神经管构建属初级型,后端部分(后肢以后)神经管构建却属次级型。在非洲爪蟾等两栖类中,蝌蚪绝大部分神经管通过初级神经胚形成产生,只有尾神经管通过次级神经胚形成产生。在小鼠(可能包括人类)中,在第 35 体节水平以后的神经管通过次级神经胚形成产生。

1. 初级神经胚形成

脊椎动物原肠作用产生一个由内部的内胚层、中间的中胚层和外部的外胚层组成的三胚层胚胎。胚胎背部的中胚层和覆盖在上面的外胚层之间的相互作用是发育中最重要的相互作用之一,因为它启动器官形成(organogenesis),即特异性组织和器官的产生。在这种相互作用中,脊索中胚层指导上方的外胚层形成中空的神经管,它将来分化成脑和脊髓。图 5.2 示初级神经胚形成过程中,最初的外胚层被分成三种类型的细胞:① 位于内部的神经管细胞,将来形成脑和脊髓;② 位于外部的皮肤表皮细胞;③ 神经嵴细胞,它从神经管和表皮连接处迁移出来,将来形成周围神经元和神经胶质、皮肤的色素细胞和其他细胞类型。

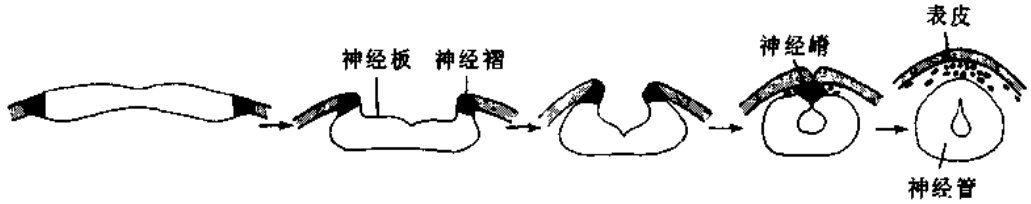


图 5.2 两栖类和羊膜动物神经管形成示意图

外胚层可以形成神经嵴(黑色)、神经管(白色)和表皮(灰色)。形成外部表皮的背部顶端外胚层褶和内部神经管通过神经嵴细胞相连

蛙的初级神经胚形成过程如图 5.3 所示。其余两栖类、爬行类、鸟类和哺乳类初级神经胚形成过程也与蛙相似。外胚层预定形成神经组织的第一个标志是细胞形状的改变(图 5.4):中线处的外胚层细胞变长,而预定形成表皮的细胞变得更加扁平。背中线处外胚层细胞的变长使预定神经区上升到周围外胚层的上面,由此形成神经板(neural plate)。据估计,神经板中的外胚层细胞约占整个外胚层细胞的 50%。神经板形成后不久,边缘加厚,并向上翘起形成神经褶(neural fold)。在神经板中央出现的U型沟即神经沟(neuralgroove),它将胚胎未来的右边和左边分开。神经褶向

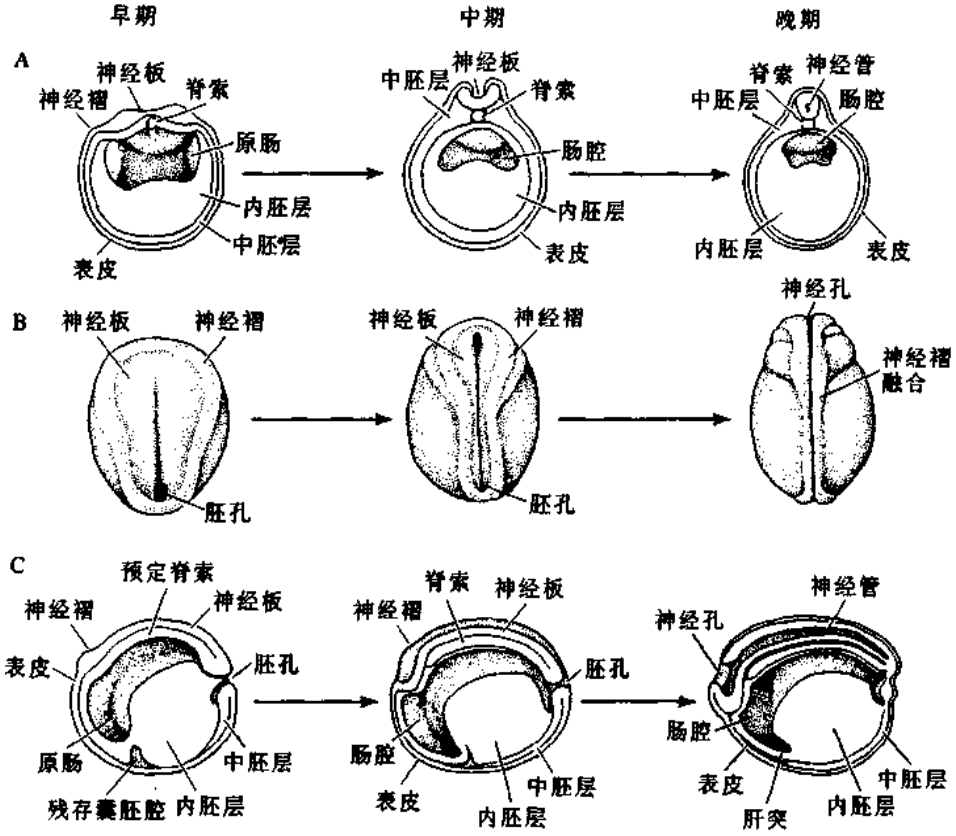


图 5.3 蛙神经胚形成

A. 经过胚胎中部的横切面 B. 同期神经胚整体背面观 C. 经过胚胎中线的矢切面

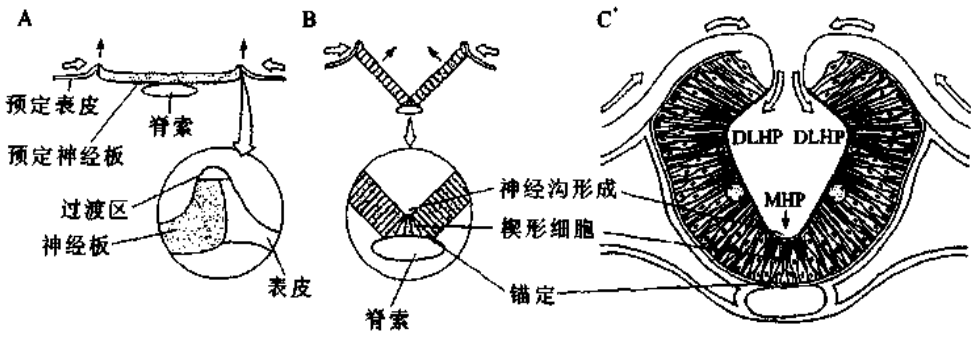


图 5.4　鸡神经胚形成时表皮细胞的弯曲

A. 当预定表皮细胞向胚胎中线处运动时，形成神经褶　B. 由于神经板(底板细胞)栓系于脊索上，所以神经褶上举　C. 在三个铰合处(中间铰合点 MHP 和两个背侧铰合点 DLHP)神经板细胞变长，顶部收缩

胚胎背中线迁移，最终合拢形成神经管，上面覆盖着外胚层。神经管最靠背面部分的细胞变成神经嵴细胞(neural crest cell)。

身体不同区域的神经管形成方式略有不同。头部、躯干和尾部等每一部分神经管的形成方式都反映出脊索和上面覆盖的外胚层之间的关系。头部和躯干部分神经管形成主要以初级神经胚形成方式进行，略有变化。其过程可以分为彼此独立但在时空上又相互重叠的 5 个时期：神经板形成；神经底板形成；神经板的整形(shaping)；神经板弯曲成神经沟；神经沟闭合形成神经管。

(1) 神经板形成

一般认为，神经板作为一个与其他外胚层细胞明显不同的区域，是由下方背中胚层(与胚胎其他区域合作)发出信号指导其上方外胚层细胞发育成柱状神经板细胞而形成的。作为这种神经诱导的结果，预定的神经板细胞从其周围预定形成表皮的外胚层中分化出来。

神经板细胞和表皮细胞都能发生固有运动(intrinsic movements)。如果把神经板周围的表皮细胞分离下来，它们会发生向心运动(朝神经板所在区域运动)；如果把神经板细胞分离下来，它们会集中并延伸形成薄板，但不能卷成神经管。神经板和表皮细胞的运动导致神经管的形成。外胚层首先扭结，随后预定表皮开始向神经板上面覆盖(把含有神经和表皮两种组织的"过渡区域"分离培养，就会形成小的神经褶)。这种协调一致的运动最终引起神经管举起和交叠。

(2) 神经底板形成

以前认为只有神经板中线处细胞才能形成神经管底板。这就是说，当神经板闭合形成神经管时，位于神经板中间的大部分细胞竖立于神经管底部，而外缘部分和神经褶则构成神经管最靠背面的部分。头部神经底板形成方式可能也是这样。但是，新近证据表明：躯干神经管底板具有独立起源，即由亨氏结一部分细胞"插入"神经板中央形成。

神经底板的"插入"形成模型由 Catala 等(1995)提出。他们用鸡－鹌鹑镶嵌体去跟踪单个亨氏结细胞运动。鹌鹑和鸡胚早期发育极为相似。把鹌鹑胚胎一部分移植到鸡胚相同区域，细胞便整合到受体胚胎中，并参与形成适当的器官。由此孵化出来的小鸡是镶嵌体(chimera)，即其身体一部分由鹌鹑细胞构成。然而，鹌鹑和鸡的细胞毕竟不同。首先，鹌鹑细胞核内异染色质浓缩于核仁周围，形成一大块着色很深的物质，与鸡细胞内弥散型异染色质很容易区分；其次，鹌鹑细胞中存在一些鸡细胞中不具备的特异性抗原。基于上述两点，很容易把单个鹌鹑细胞和鸡细胞区别开来。

Catala 等(1995)把 1.5 天(6－肌节)鸡胚的亨氏结和正在延伸的脊索尾端去掉,用鹌鹑对应部分取代。这样,胚胎在移植部位的脊索和底板都由鹌鹑细胞构成,而神经管壁则由鸡神经板构成。有趣的是,底板和脊索细胞两者都与位于尾部的神经板相连而不是与亨氏结本身相连。因此,亨氏结包含形成尾部底板和脊索所必需的细胞。

神经板细胞开始与背面外胚层中央相连。到后来,在脊索和底板之间形成一层基膜,延伸把两者分隔开来。因此,神经管细胞有两个不同的来源:外胚层细胞和亨氏结细胞。

(3) 神经板的整形和弯曲

神经板的整形与神经板细胞内在力量直接有关。随着细胞变成高柱状,导致神经板变窄。但是,神经板最主要的整形作用是通过紧位于脊索上面的神经板中线细胞来形成的。在鸟类和哺乳类,神经板中线细胞称为中间铰合点(median hinge point,MHP)细胞,它们由亨氏结前端中线细胞衍生而来。在两栖类和羊膜类中,神经板通过数层细胞互相插入形成几层细胞构成的细胞层而集中伸展,使神经板变长、变窄。

神经板的弯曲通过神经板细胞内外力量的作用而实现。在鸡胚中,神经板随着自身整形而开始弯曲。中间铰合点细胞被锚定在其下方的脊索上,形成背中线处沟形的铰合。脊索诱导中间铰合点细胞变矮,形成楔状,其两侧细胞则不发生这种变化。此后不久,靠近神经板与外胚层连接处形成另外两个沟形铰合区,这两个铰合区被称为背侧铰合点(dorsolateral hinge point;DLHP),它们被锚定在神经褶的表面外胚层上。DLHP 细胞变高形成楔状。细胞变成楔状与细胞形状改变密切相关,而细胞形状的改变则与微管和微丝参与有关。微管聚合抑制剂秋水仙素能抑制这些细胞伸长,而微丝形成抑制剂细胞松弛素 B 则能阻止这些细胞顶部收缩,抑制楔状细胞形成。神经板形成初始沟之后,围绕铰合区弯曲;每一铰合点都作为一个支点(轴)指使细胞围绕它旋转。同时,外在力量也在起作用。鸡胚的表面外胚层朝鸡胚的中央推,为神经管的弯曲提供另一种动力。预定表皮的这种运动以及神经板锚定于下面脊索中胚层上对于确保神经管凹入胚胎而不外凸可能起重要作用。如果把一小块神经板从胚胎上分离下来,它们会把里面翻转到外面。

(4) 神经管闭合

当左右神经褶被牵引到背中线结合到一起时,神经管随即闭合。神经褶先互相粘贴在一起,接着两侧神经褶细胞合并。在某些动物中,神经褶连接处的细胞形成神经嵴细胞。在鸟类,直到神经管在背区闭合后,神经嵴细胞才从背部区域迁移出来;但在哺乳类,早在神经褶举起来时,头部神经嵴细胞就开始迁移(即先于神经管闭合),而脊髓区域神经嵴细胞直到神经管闭合后才迁移。

神经管的形成并非在整个外胚层同时发生。这在体轴的伸长先于神经胚形成的脊椎动物如鸟类和哺乳类中清楚可见。对于 24 小时鸡神经胚来说,当其尾部区域仍在进行原肠作用时,头部神经管已明显形成。神经管的区域化也随神经管形状变化而发生。在头部末端(形成脑的部位),神经管壁又宽又厚。在这里出现一系列膨胀和收缩,从而界定大脑的各个分区。但是,头区至尾部神经管仍维持简单的管状,并向尾部方向逐渐变细。神经管前端和后端的两个开口分别称为前端神经孔和后端神经孔。

与鸡的神经胚形成不同,哺乳类神经管的闭合在沿前后轴的几个部位同时开始。当神经管的各个部分不能合拢时就会引起不同的神经管缺陷(图 5.5)。人的后端神经管区域在 27 天时不能合拢(或后端神经孔此后不久破裂)就会产生一种称为脊髓裂(spina bifida)的缺陷,其严重性取决于脊髓保持开放的程度。相比之下,前端神经管区域不能合拢则产生一种称为无脑畸形(anen-

cephaly)致命缺陷。起初,前脑与羊水保持连接,但接着退化;胎儿前脑发育停止,颅骨拱顶就不能形成。这些异常在人类并不罕见,约占所有新生儿的0.2%(1/500)。神经管合拢缺陷在妊娠期间可以通过各种物理和化学方法检测出来。

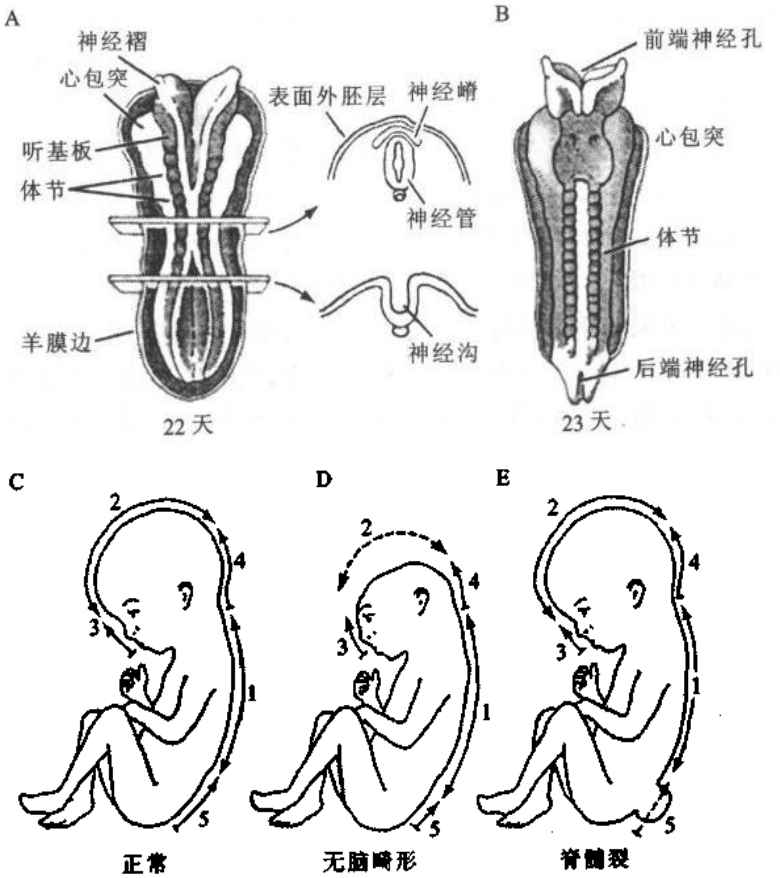


图5.5　人类胚胎神经胚形成

A. 神经胚开始形成的人22天胚胎背部观及横切面观。前端和后端神经孔都开口与羊水相通　B. 神经胚正在形成的人23天胚胎背部观。前端神经孔正在闭合,而后端神经孔仍然开口　C. 由遗传证据推导的神经管闭合区域　D. 由于2区神经板不能融合而产生的无脑畸形　E. 由于5区神经板不能融合而产生的脊髓裂

人类神经管闭合与遗传因子和环境因子之间相互作用有关。*Pax3*、*sonic hedghog* 和 *open-brain* 等基因都是哺乳类神经管形成所必需的,但胆固醇和维生素 B_{12} 等饮食因素也至为关键。据估计:大约50%神经管缺陷可由孕妇补充叶酸(维生素 B_{12})加以避免。因此,美国公共健康服务中心(U. S. Public Health Service)推荐所有育龄妇女每天摄取0.4 mg叶酸(folate)以减少妊娠期间胎儿患神经管缺陷的危险。

神经管最终形成一个与表面外胚层分离的闭合的圆柱体。神经管和表面外胚层的分离被认为是受不同的细胞粘连分子表达调节的。尽管形成神经管的细胞最初都表达E-细胞选择蛋白,但随着神经管的形成,它们停止产生E-细胞选择蛋白,代之以合成N-选择蛋白和N-CAM。结

果,两种组织不再粘附在一起。假如表面外胚层被迫表达 N－选择蛋白(通过注射 N－选择蛋白 mRNA 到非洲爪蟾 2－细胞胚胎中一个细胞内),那么,神经管和预定表皮的分离将显著被阻。

2. 次级神经胚形成

次级神经胚形成包括髓索(medullary cord)形成及其随后空洞化成为神经管。在蛙和鸡胚中,通常在腰椎和尾椎(lumbar and tail vertebrae)形成时能观察到这种类型的神经胚形成。在上述两种情况下,次级神经胚形成都可以看作是原肠作用的继续。不过,背唇细胞并不卷入胚胎内,而是在腹面不断生长(图 5.6)。胚唇端部不断生长的区域称为脊索神经铰合(chordoneural hinge),包含神经板最后端和脊索后端部分。脊索神经铰合区的生长把大致呈球形的非洲爪蟾原肠胚(直径 1.2 mm)转变成长为 9 mm 的蝌蚪,其尾端是背唇的直接衍生物,而排列在胚孔内四周的细胞则形成神经肠管(neurenteric canal)。神经肠管末端部分与肛门融合,而远端部分成为室管膜腔(ependymal canal)即神经管腔。在鸡胚中,位于刚闭合神经孔后端的组织称为尾芽(tailbud)。和蛙尾芽一样,鸡尾芽也是一团未分化的细胞。把一小块鹌鹑尾芽移植到鸡尾芽上,Catala 等(1995)证明:早期尾芽细胞命运已经决定。如同在非洲爪蟾中一样,鸡胚胎中也存在脊索神经铰合,它包含分裂形成脊索和髓索的细胞,这些细胞都向后运动。神经管随着髓索形成的小腔彼此融合而形成。

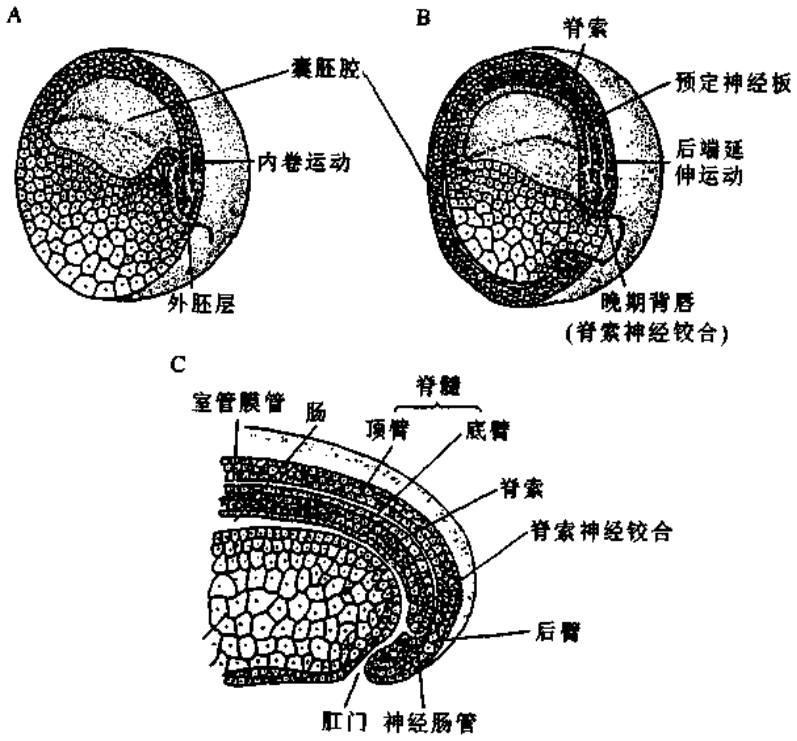


图 5.6 非洲爪蟾次级神经胚形成时的细胞运动

A. 中期原肠胚时中胚层的内卷 B. 晚期原肠胚或早期神经胚时背唇的运动。此时内卷停止,晚期胚孔的外胚层和中胚层向后运动 C. 早期蝌蚪中,胚孔衬里细胞形成神经肠管,其一部分形成神经管腔

3. 脑区形成

神经管同时在三个层次水平上分化成中枢神经系统的不同区域。在解剖学水平，神经管及其管腔膨胀和收缩而形成脑室和脊髓的中央管。在组织学水平，神经管壁细胞发生重排形成脑和脊髓不同的功能区域。在细胞学水平，神经上皮细胞本身分化成身体中不同类型的神经元和神经胶质(详见第十一章)。

大多数脊椎动物脑的早期发育都是相似的。哺乳类早期神经管是一个笔直的结构。但是，早在神经管后部形成之前，神经管的最前端部分已在发生剧烈的变化。在前部区域，神经管膨大成三个原始的脑泡(图 5.7)：前脑(prosencephalon)、中脑(mesencephalon)和菱脑(rhombencephalon)。至神经管后端合拢时，次生膨大眼泡已从正在发育的前脑两侧面凸出来。

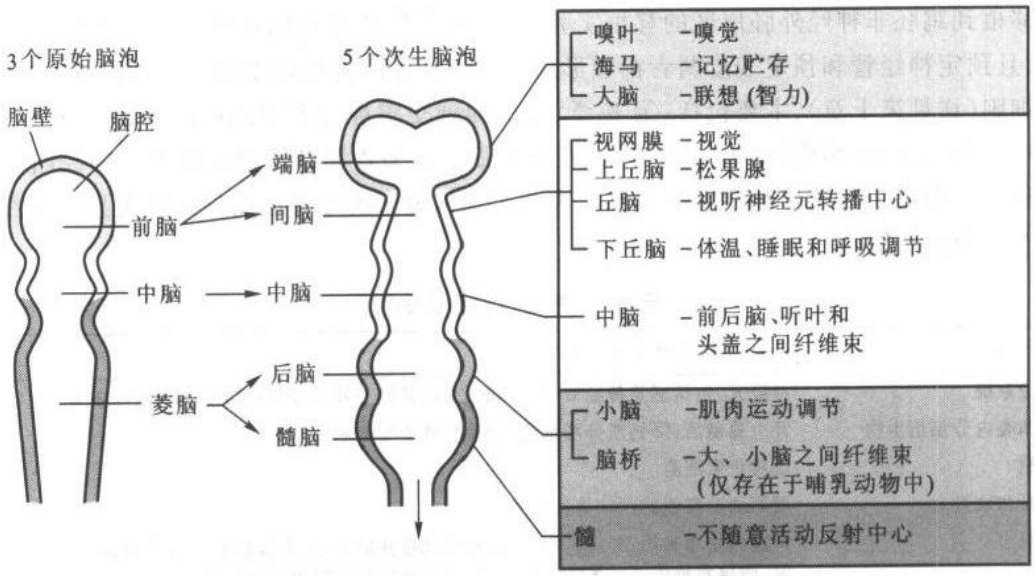


图 5.7　人脑早期发育

随着发育进行，形成三个原始脑泡。右边方框内示脑泡壁和脑泡腔在成体中形成的衍生物

前脑再细分为前端的端脑(telecephalon)和稍后的间脑(diencephalon)。端脑最终形成大脑两半球，间脑形成丘脑和下丘脑以及接收来自视神经输入端区域。视网膜本身也是间脑的衍生物。中脑不再细分，其腔最终形成大脑导水管。菱脑又细分成后部的髓脑(myelencephalon)和稍前端的后脑(metencephalon)。髓脑最终形成延髓(medulla oblongata)，其神经元发出神经支配呼吸、胃肠道和心血管的生理活动；后脑形成小脑(cerebellum)，即负责调整运动、姿势和平衡的部分。菱脑发育成节段性模式，规定某些神经发生的区域。称为菱形节(rhombomere)的周期性膨大将菱脑分成更小的区域，菱形节代表一个单独发育的“区域”，因为每个菱形节的细胞都能在节内自由混合，但不能与相邻菱形节的细胞混合。再者，每一菱形节都有不同的发育命运。这在鸡胚中研究最为广泛。鸡胚最初的神经元出现在偶数的菱形节：r2、r4 和 r6。来自 r2 神经节的神经元形成第 5 对(三叉)脑神经；来自 r4 神经节的神经元形成第 7 对(面部)和第 8 对(前庭)脑神经；第 9 对脑神经(舌咽)来自 r6。

早期胚胎脑的膨大是异乎寻常的，这不仅表现在其膨大速度和程度，而且表现在膨大主要是腔

的增加而不是组织生长的结果。鸡胚脑体积在 3～5 天的发育中扩大 30 倍。据认为:这种迅速膨胀是由神经管里的液体挤压管壁而产生的正向液压造成的。或许可以预期脊髓将使液压消散,但这似乎并没有发生。相反,当预定脑和脊髓之间的神经褶合拢时,背部周围组织向内推挤使神经管在脑基部收缩。这种收缩(在人脑也出现)有效地将预定脑区和未来脊髓分开。假如将闭合神经管前端部分的液压去掉,鸡脑变大的速度大为减慢,且所含有细胞数比正常对照大为减少。神经管已闭合区域在脑室开始迅速扩大后又重新打开。

二、神经嵴

神经嵴尽管来源于外胚层,但是,由于其重要性而有时被称为第四胚层。有人曾夸张地说"脊椎动物惟一令人感兴趣的东西就是神经嵴"。神经嵴细胞起源于神经管最靠背部的区域。把鹌鹑神经板移植到鸡胚非神经外胚层区的移植实验表明:把上述两种组织并置在一起能诱导神经嵴细胞形成,且预定神经管和预定表皮两者都能形成神经嵴细胞。神经嵴细胞广泛迁移,产生各种类型的分化细胞(详见第十章),主要包括:① 感觉、交感和副交感神经系统的神经元和神经胶质;② 肾上腺中产生肾上腺素(髓质)的细胞;③ 表皮色素细胞;④ 头骨和结缔组织成分。神经嵴细胞的命运很大程度上取决于其迁移和定居的位置。表 5.1 示部分来源于神经嵴的细胞类型。神经嵴可以分成 4 个主要的功能部分。

表 5.1 神经嵴部分衍生物

衍 生 物	细胞类型或衍生的结构
周围神经系统	神经元,包括感觉神经节、交感和副交感神经节和神经丛;神经胶质;施万细胞
内分泌和类内分泌衍生物	肾上腺髓质;降钙素分泌细胞;颈动脉体Ⅰ型细胞
色素细胞	上皮色素细胞
面部软骨和硬骨	面部和前腹侧的颅软骨和硬骨
结缔组织	角膜内皮和基质;牙齿乳头;头部和颈部皮肤的真皮、平滑肌和脂肪组织;唾液腺、泪腺、甲状腺、胸腺和垂体的结缔组织;动脉弓发出动脉的结缔组织和平滑肌

三、表皮和皮肤结构起源

1. 表皮细胞起源

神经胚形成之后覆盖胚胎表面的细胞构成预定表皮。开始,表皮只由一层细胞组成,但在多数脊椎动物中,表皮很快成为两层结构。外面一层形成胚皮(periderm),胚皮是临时性结构,一旦底层细胞分化成表皮,胚皮便脱落。内面一层细胞称为基层(basal layer)或生发层(stratum germinativum),它是能形成所有表皮细胞的生发性上皮(图 5.8)。生发层细胞分裂产生外面另一层细胞,构成棘层(spinous layer)。棘层和生发层一起构成马尔皮基层(Malpighian layer)。马尔皮基层细胞再分裂产生表皮的颗粒层(granular layer)。颗粒层细胞内含有角蛋白颗粒,它和仍保留在马尔皮基层内的细胞不同,细胞不再分裂,而开始分化成表皮细胞即角质细胞(kenatinocytes)。随着颗粒层细胞成熟并向外迁移,细胞内角质颗粒越来越明显,最终,角质细胞形成角质层(cornified layer 或 stratum corneum)。角质层细胞变成包含角蛋白的扁平囊状细胞。角质层厚度不同区域不一样,但一般为 10～30 层细胞厚。角质层细胞的细胞核都被挤到细胞的一侧。角质层细胞生成后不久便脱落,并被由颗粒层新形成的细胞所取代。整个生命过程中,死亡的角质化细胞不断脱落,并不断被新细胞所取代。取代角质细胞的细胞来源是马尔皮基层细胞的有丝分裂。由神经嵴细胞形成的色素细胞也存在于马尔皮基层中,它们把色素体(melanosome)转移给正在发育的角质细胞。

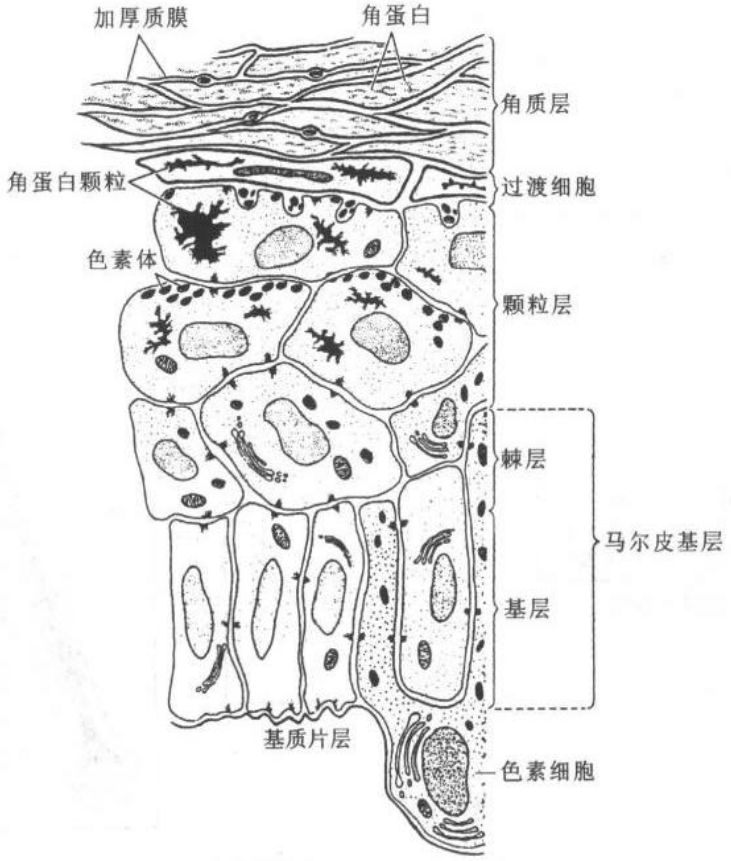


图 5.8　人表皮图解

基部细胞进行活跃有丝分裂，而表皮外层充分角质化的细胞不断死亡脱落。位于基部的色素细胞突起将色素颗粒转移到角质细胞中

马尔皮基层表皮干细胞通过整连蛋白(integrin)预定形成基底膜(basement membrane)。不过，伴随着决定分化，表皮干细胞整连蛋白表达下降；最后，当细胞迁移到棘层时，便完全失去整连蛋白。

有两种主要生长因子能刺激表皮发育。第一种是转化生长因子－α(transforming growth factor－α，TGF－α)。TGF－α 由基层细胞合成，并促进基层细胞自身分裂。当生长因子由一个细胞合成并由同一个细胞接受时，该生长因子称为自分泌生长因子(autocrine growth factor)。自分泌生长因子的表达必须受到精细调控，因为其含量增加，将导致快速产生更多的细胞。在成体皮肤中，马尔皮基层中形成的细胞大约需要 8 周才迁移到角质层，而维持在角质层中大约 2 周时间。银屑病(psoriasis)患者特征是大量表皮细胞脱落。在银屑病患者中，角质化细胞迁移到角质层后只能在角质层内维持 2 天。这种情况可能与 TGF－α 过度表达有关。同样，如果把 TGF－α 基因连接到角蛋白 14(一种皮肤主要蛋白)启动子上，注射到小鼠受精卵原核中，那么转基因小鼠中 TGF－α 基因被激活表达，且其表达不能形成负调控。其结果是，小鼠具鳞状皮，毛出现生长障碍，并形成大量过剩的角质化表皮。

表皮生长所需的另一种生长因子是角质细胞生长因子(keratinocyte growth factor，KGF)，也称为成纤维细胞生长因子 7(FGF7)。KGF 是真皮(中胚层来源)下面的成纤维细胞产生的一种外分泌生长因子。真皮成纤维细胞上面的基层细胞接受 KGF 能调节基层细胞的增殖。如果 *KGF* 基因和角蛋白 14 启动子融合，并用来制作转基因小鼠，则 KGF 成为自分泌型。其结果是：转基因小鼠表皮加厚，皮肤松弛下垂，基层细胞过多，缺乏毛囊。

2．皮肤附属物

表皮和真皮在特定区域相互作用形成汗腺和毛发、鳞或羽毛等皮肤附属物。在特定位置形成毛囊最早的迹象

是表皮基层细胞聚集。基层细胞的聚集受下面真皮细胞的影响，并发生在胚胎不同位置和不同时间。基层细胞变长、分裂并陷入真皮。真皮细胞通过表皮栓(epidermal plug)下面形成真皮乳突(dermal papilla)，对表皮基层细胞的内移作出反应。真皮乳突随后推挤并刺激基层干细胞更快分裂，产生有丝分裂细胞，将来分化成角质化毛干(hair shaft)。表皮细胞中的成色素细胞分化成色素细胞，并把色素转移给毛干(图 5.9)。与此同时，在毛囊边上开始形成两个上皮凹陷。下面凹陷的细胞仍保持为干细胞，能在毛干脱落后周期性地再形成毛干。上面凹陷的细胞将形成皮脂腺(sebaceous gland)，产生脂类分泌物皮脂(sebum)。在包括人在内的许多哺乳类中，皮脂和脱落的胎皮细胞混合，形成乳白色的胎儿皮脂(vernix caseosa)。胎儿皮脂在出生时包围在胎儿周身。

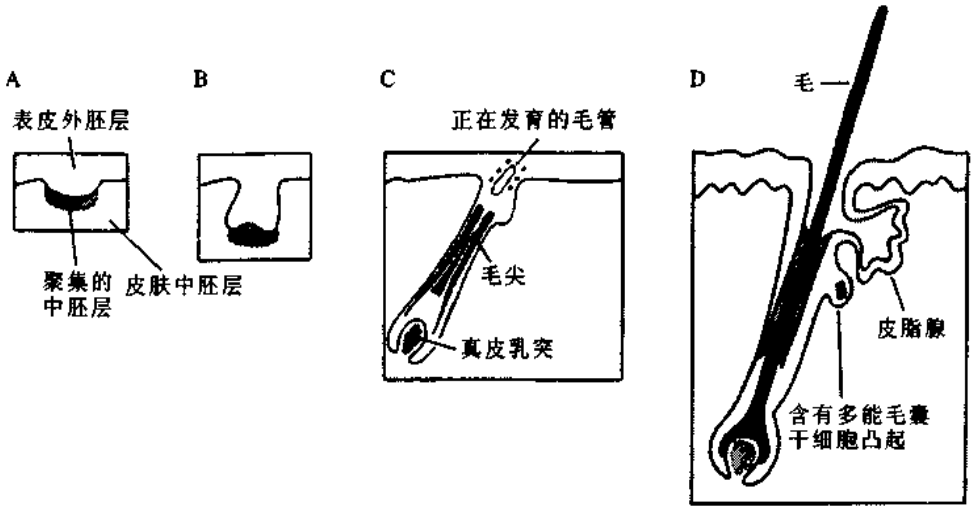


图 5.9 人胎儿中毛囊的发育

A. 基部表皮细胞变成栓状，略微向真皮内凸出 B. 表皮细胞继续分裂，真皮间质细胞在初级毛胚基部聚集 C. 在变长的毛胚中，毛干开始分化 D. 角质化毛干从毛根部伸出。毛囊边上形成两个凹陷：上面的凹陷形成皮脂腺，下面的凹陷内含有毛发干细胞

人胚胎最早的毛发细而致密，称为胎毛(lanugo)。这种类型毛发通常在出生前脱落，并被短丝状毫毛(vellus)取代。毫毛保留在人身上许多被认为是无毛的部分，如前额和眼睑，而在身体其他部位，毫毛则让位于“终端”毛发(“terminal”hair)。在人的一生中，某些产生毫毛的毛囊后来能产生终端毛发，最后又能变回再产生毫毛。例如，婴儿腋窝就具有直到青春期还能产生毫毛的毛囊。到青春期时，终端毛干出现。相反，正常男性秃顶(baldness)就是由于头皮毛囊变回去，形成无色素极细毫毛所致。毛发、羽毛、鳞片和汗腺的位置及图式都与真皮和表皮相互作用有关。正像存在多能神经干细胞其后代能分化成为神经细胞和神经胶质一样，也存在多能表皮干细胞，其后代能发育成为表皮、皮脂腺或毛干。

第二节 中 胚 层

神经胚期中胚层可分成 5 个区域。第一个区域是位于胚胎背面中央的脊索中胚层，形成脊索。脊索是一种诱导神经管形成以及前后轴建立的临时器官。第二个区域是背部体壁中胚层，形成体节和神经管两侧的中胚层细胞，将来产生背部许多结缔组织(骨、肌肉、软骨和真皮)。第三个区域是中段中胚层，形成泌尿系统和生殖器官。第四个区域是离脊索稍远的侧板中胚层，形成心脏、血

管、血细胞以及体腔衬里和除肌肉外四肢所有中胚层成分。此外，侧板中胚层也形成一系列的胚胎外膜，胚胎外膜在给胎儿输送营养物质中起重要作用。最后一个区域是头部间质，形成面部结缔组织和肌肉。

一、脊索和体节分化

1. 轴旁中胚层

中胚层和内胚层器官的形成并非发生在神经管形成之后，而是同步发生。脊索呈棒状，从头基部延伸到尾部；在脊索两边是加厚的中胚层带，即轴旁中胚层(paraxial mesoderm)。轴旁中胚层带在鸟类被称为体节板(segmental plate)，在哺乳类称为不分节中胚层(unsegmented mesoderm)。随着原条退化和神经褶开始在胚胎中央合拢，轴旁中胚层分隔成细胞模块，称为体节。尽管体节是临时结构，但它们在组建脊椎动物胚胎的分节模式中极其重要。体节能决定神经嵴细胞的迁移路径和脊髓的神经轴突。体节产生构成脊椎和肋骨、背部皮肤真皮和骨骼肌以及体壁与四肢骨骼肌细胞。

2. 体节小体和体节形成

第一对体节在胚胎前端形成。新体节以规则的间隔从吻端轴旁中胚层"萌发"。由于胚胎发育速度略有差异，因此，体节数目通常是发育进程最佳指标。所形成体节总数具有种的特异性。

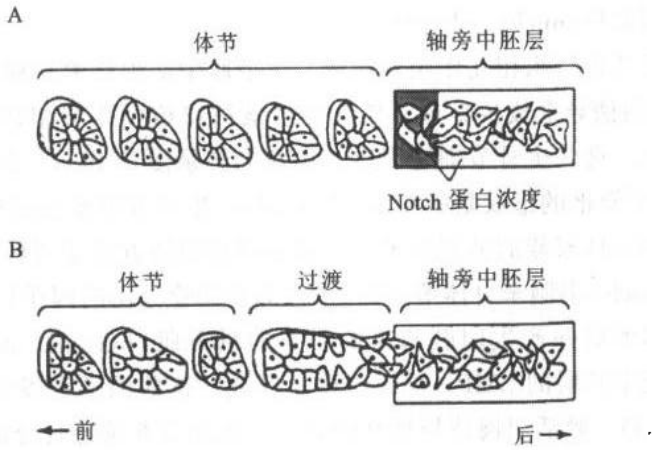


图 5.10　体节小体转化成体节

N－细胞选择蛋白表达和松散间质细胞转变成表皮体节相关。A. 在野生型胚胎中，*notch1* 基因在未分节轴旁中胚层最前端区域表达　B. 在 *notch1* 缺陷型胚胎中，体节组织混乱

体节的形成机制尚未很好研究。但是，对鸡胚的研究显示，体节板细胞组织形成轮状，称为体节小体(somitomere)。随着最前端的体节小体变成致密结构，体节小体便转变成体节。从松散的体节小体转变成上皮性体节和两种细胞外基质蛋白(纤连蛋白和 N－细胞选择蛋白)的合成有关(图 5.10)。这些蛋白的合成又受 *notch1* 和 *paraxis* 的表达调控。*notch*1 基因编码的转录因子在不分节背部中胚层最前端区域有活性；缺乏 Notch 蛋白的小鼠体节排列紊乱，大小不一。*paraxis* 也编码一种转录因子，在小鼠和鸡胚吻端不分节中胚层表达。注射与 *paraxis* 互补的反义寡核苷酸导致体节分节出现缺陷。新形成的正常体节细胞先随机组织，但很快形成一个由柱状上皮细胞

构成的球形结构,其中间很小的体腔内充满松散连接的细胞。柱状上皮细胞通过紧密连接相互联系。Paraxis 蛋白是实现上述从间充质到上皮转换的必要成分。

3. 体节细胞分化

当体节最初形成时,任何体节细胞都能变成所有体节衍生的结构。但是,随着体节成熟,体节各区定型只能形成一定的细胞类型。体节腹中部细胞(离背部最远、离神经管最近的细胞)经过有丝分裂,失去圆形上皮细胞特征,再度变成间充质细胞。产生这些细胞的体节部分被称为生骨节(sclerotome),这些间充质细胞最终变成脊椎的软骨细胞。软骨细胞负责分泌软骨特有的胶原和硫酸软骨素等。这些特殊的软骨细胞将负责构建轴性骨骼(脊椎、肋骨、软骨和韧带)。体节侧面细胞(离神经管最远的区域)也分散开,形成四肢和体壁肌肉前体。Ordahl 和 Le Douarin(1992)通过移植鹌鹑部分体节到鸡胚体节中来跟踪这些细胞变化,鸡和鹌鹑细胞可通过核仁的形态辨别。他们发现,即使供体细胞来自体节腹中部,离神经管最远的体节细胞都迁移形成体壁和四肢肌肉。

一旦生骨节细胞和体壁及四肢肌细胞前体从体节中迁移出来,最靠近神经管的体节细胞向腹面迁移,保留下来的体节上皮形成双层实心上皮,称为生皮肌节(dermamyotome; 图 5.11)。生皮肌节的背层称为生皮节(dermatome),产生背部皮肤的间充质结缔组织,即真皮(身体其他区域真皮由另外的间充质细胞形成,并非来自体节),而其内层细胞称为肌节(myotome),产生横跨脊椎使背部能够弯曲的脊椎肌肉。因此,体节对身体背部的形成至关重要。那么,脊索发生了哪些变化? 在为早期胚胎提供完整的体轴和诱导背部神经管形成之后,大部分脊索退化,在脊椎之间,脊索细胞形成椎间盘的组织即髓核(nuclei pulposi)。

体节特化是通过几种组织相互作用而完成。体节腹中部由脊索和神经管底板分泌的因子尤其是 sonic hedgehog 蛋白诱导形成生骨节。如部分脊索被移植到体节相邻的另一区域,则受体区域也将变成生骨节细胞。这些生骨节细胞表达一种新的转录因子 Pax1。Pax1 能激活软骨特异性基因表达,它的存在对于脊椎的形成是必要的(图 5.12)。生骨节细胞也表达 I-mf,I-mf 是启动肌肉形成的转录因子 MyoD 家族的抑制因子。生肌节以相似的方式受两种不同信号诱导。围绕体轴的轴上肌(epaxial muscle)细胞来自体节中部,由背部神经管分泌的因子(可能是 Wnt 家族成员)诱导形成。从体节中部形成并产生四肢和体壁肌肉的轴下肌(hypaxial muscle)可能由来自表皮的 Wnt 蛋白和来自侧板中胚层的 BMP-4 联合诱导形成。这些因子引发生肌节细胞表达特殊的转录因子(MyoD 和 Myf5),激活肌肉特异性基因表达。生皮节在神经管分泌的另一个因子神经营养蛋白 3(neurotrophin 3,NT-3)诱导下发生分化。NT-3 抗体能阻止上皮性生皮层细胞转化成在表皮下迁移的松散的真皮间质细胞。除上述阳性诱导信号外,至少还存在另外两组蛋白,都是特定区域体节图式形成所必需的。其中一组能通过不相称蛋白(inappropriate protein)阻止细胞内基因激活。例如,来自侧板中胚层的 BMP4 信号能被来自神经管的一种因子抵消,使低水平 BMP4 不能对更靠近中间的细胞发生作用,另一组蛋白则为原有诱导信号激发的基因表达模式的维持所不可或缺。

4. 肌肉生成:骨骼肌的分化

骨骼肌细胞是含多细胞核的大而长的细胞,常称为肌管(myotube)。20 世纪 60 年代中期,发育生物学家曾就骨骼肌细胞是由几个单核肌前体细胞即成肌细胞(myoblast)融合(融合模型)而成,还是由单个成肌细胞经历核分裂但胞质不分裂(分裂模型)而成,争论不休。骨骼肌成肌细胞融合形成多核肌管的最关键证据来自嵌合小鼠(chimeric mouse)。嵌合体小鼠是由 Tarkowski 和 Mintz 于 20 世纪 60 年代初首先培育出来的,他们分别将黑色小

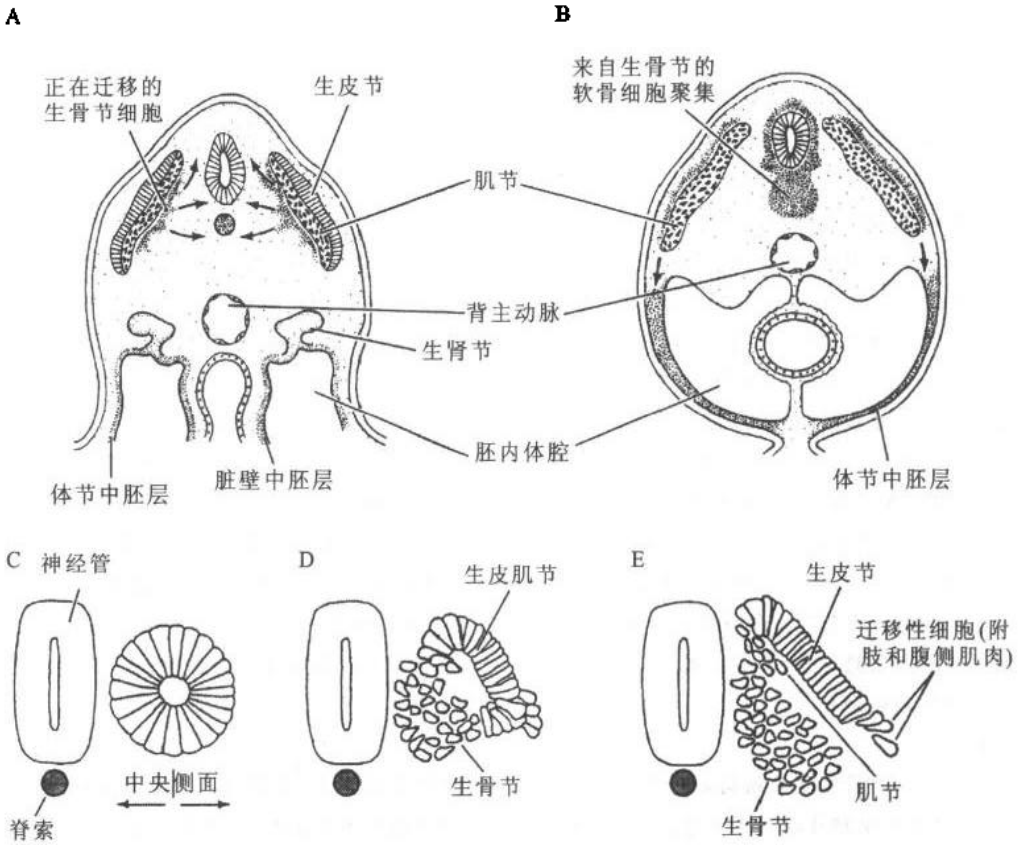


图 5.11 第 4 周初期和晚期人胚躯干部横切面,示体节结构形成

A. 生骨节细胞开始由生肌节和生皮节向外迁移 B. 第 4 周末,生骨节细胞聚集形成软骨脊椎,生皮节开始形成真皮,生肌节细胞沿胚壁向腹侧延伸 C~E. 随细胞迁移,鸡胚体节的结构变化

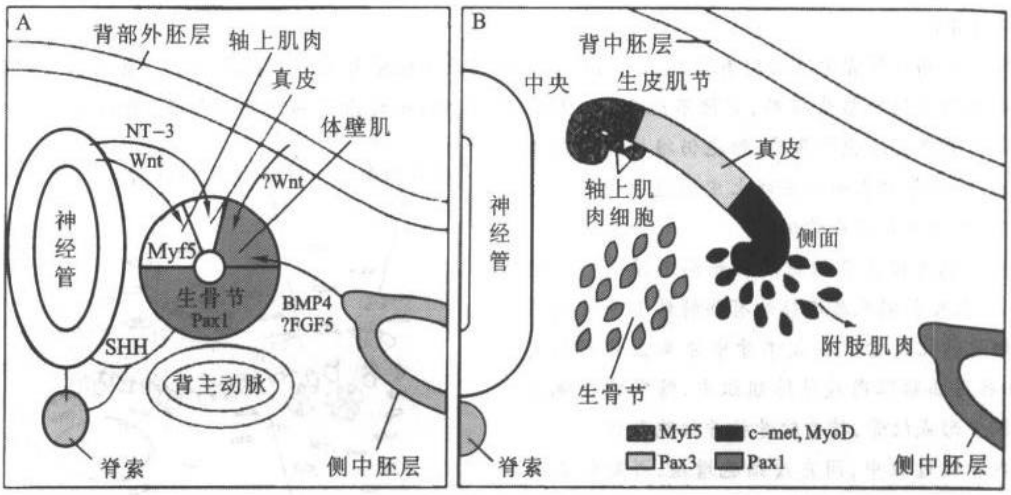


图 5.12 体节图式形成中的主要作用模式

A. 来自脊髓和底板的 sonic hedgehog 蛋白(SHH)诱导生骨节形成,来自神经管的 Wnt 蛋白诱导生肌节形成轴上肌肉,来自表皮的 Wnt 蛋白和来自侧板中胚层的 BMP4(可能还有 FGFs)配合诱导生肌节形成体壁肌,来自神经管的神经营养蛋白 3 可能诱导生皮肌节细胞分化 B. 体节不同区域的转录因子决定细胞命运,生骨节细胞表达 Pax1,中央生皮肌节细胞表达肌发生蛋白 Myf5,侧面生皮肌节表达肌发生转录因子 MyoD 和扩散因子受体 c-met,生皮肌节中间部分表达 Pax3,形成真皮

鼠和白色小鼠的 8－细胞胚胎从母体中取出，除去透明带，将两者并合，再放回养母(foster mother)子宫内，最终产生黑白相间的嵌合体小鼠。同工酶(isozyme)分析表明，嵌合体小鼠骨骼肌除产生亲本双方特有的同工酶外，还产生集双亲特点于一体的“杂交”型同工酶。这表明，不同表型的成肌细胞在体内彼此融合形成了多核的肌管(杂交细胞)。因此，肌管肯定是由多个成肌细胞融合形成的。

那么，胚胎中成肌细胞的融合是如何发生的？Konigsberg 于 1963 年发现，从鸡胚分离来的成肌细胞能在涂有胶原蛋白的培养皿中增殖。不过，大约两天后，成肌细胞停止分裂，并开始与邻近的细胞融合形成伸长的肌管，合成肌特异性蛋白。在所形成的多核肌管中，看不到 DNA 的合成和细胞核分裂。成肌细胞融合是发生在成肌细胞表面一系列复杂生物化学事件协调统一的结果。成肌细胞融合第一步似乎是细胞退出有丝分裂周期。只要培养基中存在特殊的生长因子(特别是成纤维细胞生长因子)，成肌细胞就只增殖而不分化。当培养基中生长因子耗尽时，成肌细胞即停止分裂，分泌纤连蛋白到胞外基质中，并通过纤连蛋白主要受体 $\alpha5\beta1$ 整连蛋白结合到胞外基质上。如纤连蛋白和胞外基质结合被阻断，肌肉发育就不能发生。显然，整连蛋白和纤连蛋白连接对于启动成肌细胞分化为肌细胞至关重要。融合第二步是成肌细胞排列成链状。这一步受细胞膜糖蛋白，包括几种细胞选择蛋白和细胞粘连分子(CAMs)调控。只有当两个细胞都是成肌细胞时，细胞之间才能彼此识别和并列在一起。只要都是成肌细胞，不管是鼠的或是鸡的，都能发生融合。成肌细胞融合第三步是融合事件本身。像多数质膜融合一样，钙离子是必需的，融合甚至可以由钙离子载体，如 A23187(它能携带钙离子穿越细胞膜)所激活。细胞融合还受一组被称为融素(meltrin)的金属蛋白酶调控。融素蛋白质是在寻找成肌细胞中和受精素(fertilin)同源的蛋白时发现的。受精素参与精卵质膜融合，而 α－融素在成肌细胞中的表达与融合开始时间大致相同；α－融素信使反义 RNA 加到成肌细胞中能抑制融合。

5. 骨发生

体节中胚层衍生的最明显的结构是骨骼。有三种不同的生骨细胞谱系：生骨节产生中轴骨；侧板中胚层产生四肢骨；头部神经嵴产生鳃弓和头面部骨。骨发生(osteogenesis)有两种主要方式，且两者都与预先存在的间充质转变成骨组织有关。由间充质组织直接转化成骨组织称为膜内骨化(intramembranous ossification)，主要出现在颅骨发生中；而其他情况下，间充质细胞先分化成软骨，软骨后来被骨取代。先形成过渡型软骨再被骨细胞所取代的骨发生过程称为软骨内骨化(endochondral ossification)。

(1) 膜内骨化

膜内骨化是扁平颅骨形成的特有方式。来自神经嵴的间充质细胞与头部上皮细胞胞外基质相互作用形成骨。如间充质细胞不与胞外基质接触，骨便不能形成。Hall 等(1983)分离出头部间充质细胞，并放到培养皿中培养。如培养皿表面未覆盖细胞外基质，细胞仍维持为间充质细胞。但是，如培养皿表面被头部上皮细胞分泌的细胞外基质覆盖，则细胞分化成骨细胞。

间充质细胞转化成骨细胞的机制尚不清楚。最近有证据表明，上皮和间充质连接处有些特殊分子可能参与间充质细胞转化成骨。从成体骨中分离出骨形态发生蛋白，注射到胚胎肌肉或结缔组织中，结果能在肌肉或结缔组织中形成软骨，接着软骨被骨细胞取代。

在膜内骨化过程中，间充质细胞增殖，并凝结成致密的结节。其中一些细胞发育成毛细血管，而另一些细胞改变形状，变成成骨细胞即能分泌骨基质的细胞。成骨细胞分泌的胶原纤维－蛋白多糖基质能和毛细血管带来的钙盐结合。就这样，基质被钙化。在多数情况下，成骨细胞通过分泌一层前骨质(prebone)或类骨质(osteoid)与钙化区分开。偶尔，成骨细胞会被埋在钙化

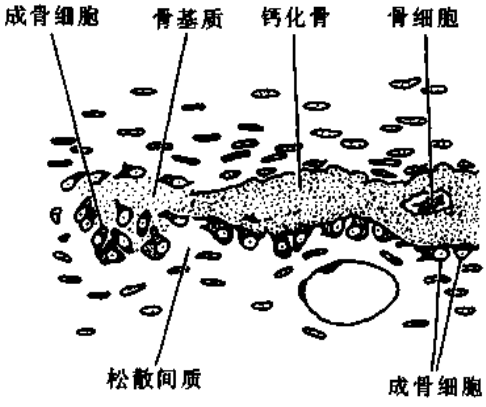


图 5.13 膜内骨化图解

来自神经嵴的间质细胞聚集形成成骨细胞，成骨细胞产生骨基质沉积。成骨细胞沿骨基质钙化区排列，被骨基质包埋的成骨细胞变成骨细胞

基质中变成骨细胞(osteocyte)。随着钙化进行,骨针从骨化开始的中央辐射而出(图 5.13)。接着,钙化骨针的整个区域被形成骨膜(periosteum)的致密间充质细胞包围。骨膜内表面的细胞也变成成骨细胞,且在与已形成骨针平行方向上不断添加骨基质。脊椎动物正是以这种方式形成多层骨。

(2) 软骨内骨化

软骨内骨化包括由间充质细胞聚集形成软骨组织和随后的软骨组织被硬骨组织所替代两个过程。软骨组织构成将要形成的骨组织的模型。脊柱、盆骨和四肢骨的骨架组成首先由软骨形成,随后才变成骨,这一过程将软骨发生(chondrogenesis)和骨生长两者有机地协调起来。这样,骨可以同时承受重量,对局部的压力作出反应和增加宽度。形成软骨组织的细胞表达转录因子 Scleraxis。据认为,Scleraxis 蛋白能激活软骨特异性基因表达(Cserjesi 等, 1995)。因此, Scleraxis 不但在生骨节中表达,而且在先形成软骨再变成骨的面部间充质以及四肢的间充质中都表达。Scleraxis 蛋白直到软骨开始被骨组织所替换时才失去活性。

软骨形成可分三个时期:间充质增殖、前软骨间充质浓缩以及软骨细胞分化。当正在分裂的前软骨间充质细胞开始表达使它们聚集成结节的细胞外基质蛋白时,软骨发生便开始了。N-细胞选择蛋白为启动前软骨间质细胞聚集所必需,而 N-CAM 则对于维持细胞聚集至关重要。前软骨间质细胞一旦聚集起来,便成为软骨细胞,并开始分泌软骨细胞特异性的细胞外蛋白多糖和胶原。

在人类,胚胎肢芽的"长骨"由骨形成区中形成结节的间充质细胞形成。这些细胞变成软骨细胞,并分泌软骨细胞外基质,而位于软骨细胞周围的间充质细胞则成为骨膜(图 5.14)。软骨"模型"形成后不久,模型中央部分的细胞显著变大,并开始分泌基质,其中含有不同类型胶原、大量纤连蛋白和少量蛋白酶抑制剂。体积显著变大的细胞即肥大性软骨细胞,其基质更易于被来自骨膜的血管细胞侵入。然后,来自骨膜的毛细血管侵入从前没有血管的软骨骨干中央。随着软骨基质退化,肥大性软骨细胞死亡。同时,由血管带入的成骨细胞开始在部分退化的软骨上分泌骨基质。最后,所有的软骨都被硬骨取代。

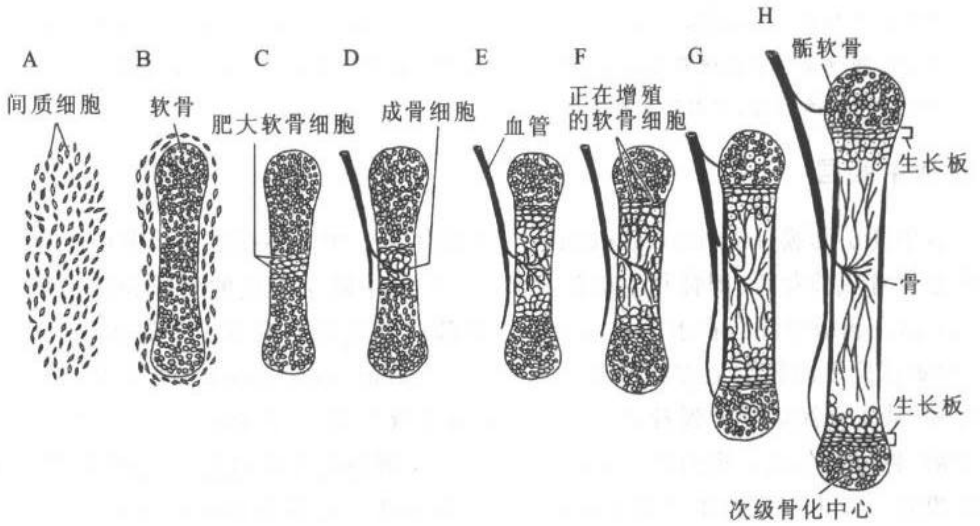


图 5.14 软骨内骨化图解

A,B. 间质细胞聚集成为软骨结节,构成了骨的初始模型 C. 骨干中央的软骨细胞出现肥大,细胞外基质发生变化,使血管能够进入其中 D,E. 血管带进成骨细胞,与正在退化的软骨基质结合,并产生硬骨基质沉淀 F-H. 由软骨细胞形成的骺生长板。软骨细胞在变肥大之前增殖,随着血管进入骨端部,形成次级骨化中心

随着模型软骨中央部分转化成骨,在新形成的骨和保留的软骨之间形成一个骨化前沿。骨化前沿软骨一侧包含肥大性软骨细胞,而硬骨一侧包含埋在骨基质中的成骨细胞。随着更多的软骨转化成骨,骨化前沿从中央由两

个方向向外扩展。如果仅有这些，那么，人就不会生长，人的骨将仅有最初软骨所构成的模型那么大。但是，实际并非如此，当骨化前沿接近软骨模型边缘时，靠近骨化前沿的软骨细胞在变成肥大性软骨细胞之前先增殖，这使骨的软骨边缘向外推出，从而提供新的软骨。长骨末端新生的软骨区被称为骺生长板(epiphyseal growth plate)。骺生长板包括三个区：软骨细胞增生区、成熟软骨细胞区和肥大软骨细胞区。随着软骨肥大和骨化前沿进一步向外扩展，骺生长板中保留的软骨增生成为骨生长区。因此，由于新软骨细胞不断形成，经历肥大、血管进入和随骨基质沉淀而死亡，骨能保持不断生长。只要骺生长板能产生软骨细胞，骨就能继续生长。

骺生长板细胞对激素是非常敏感的，生长素和类胰岛素生长因子能刺激骺生长板细胞增殖。Nilsson 等(1986)证明，生长素能刺激骺生长板中软骨细胞产生类胰岛素生长因子 I(IGF－I)，且骺生长板软骨细胞在生长素影响下增殖。当把生长素加到幼年小鼠的胫骨生长板(其垂体已被去除，所以自己不能制造生长素)，便刺激增殖区中软骨细胞形成 IGF－I。生长素和 IGF－I 联合提供极强的有丝分裂信号。扎伊尔 Ituri 丛林中的俾格米人直到青春期都具有正常水平的生长素和 IGF－I。但在青春期，俾格米人 IGF－I 水平下降，大约只有青少年期水平的三分之一。显然，IGF－I 对于激发青春期的正常生长是必不可少的。激素也与生长停止有关。在青春期末，高水平的雌激素或雄激素导致骺板软骨过度增殖。过度增殖的软骨细胞生长、死亡，并被硬骨替代。之后，软骨不再生长，骨生长也随即停止。

软骨细胞被成骨细胞取代似乎取决于细胞外基质的矿化。在鸡胚中，钙源是蛋壳中的碳酸钙。在胚胎发育期间，鸡胚循环系统大约从蛋壳中转运 120 mg 钙到骨中。如果把三天大的鸡胚从壳中取出，放到无蛋壳的培养基上(包在塑料中)培养至孵化，则有许多软骨因缺钙而不能发育成硬骨组织。在哺乳类，钙通过胎盘转运，并沉积到软骨细胞基质上。业已证明，肥大性软骨细胞能从需氧呼吸转变到厌氧呼吸，导致细胞中 ATP 下降并启用如同无氧肌肉中所使用的磷酸肌酸介导的能量途径。据认为，上述新陈代谢的变化也能导致钙沉积到基质小泡的细胞外基质中，但其机制尚不清楚。由新陈代谢变化引起的钙沉积启动了钙化过程，允许成骨细胞结合，并启动骨形成。

随着新骨质从骨膜内表面不断添加到骨周围，内部区域空泡化形成骨髓腔。骨组织的这种破坏作用是由通过血管进入骨的多核破骨细胞(osteoclasts)引起的。破骨细胞可能与血细胞来自同一前体，能溶解骨基质的无机物及蛋白质部分。破骨细胞伸出许多细胞突起进入骨基质，把破骨细胞中的氢离子泵到周围的基质中，因此，使骨基质酸化溶解。血管也输入造血细胞，它们终生停留在骨髓中。

二、侧板中胚层

并非所有中胚层套膜(mesodermal mantle)都形成体节。中段中胚层与体节中胚层毗连。中段中胚层细胞索发育成前肾管，即肾和生殖管道前体。中段中胚层每边的外侧为侧板中胚层(lateral plate mesoderm)。侧板中胚层在水平方向上分成背部位于外胚层下方的背部体节中胚层(somatic mesoderm)和腹部位于内胚层上方的脏壁中胚层(splanchnic mesoderm)。体节中胚层和脏壁中胚层之间是体腔，从未来颈区延伸到身体后部。在胚胎发育后期，右边和左边体腔融合，并从体节中胚层伸出皱褶，将体腔分成分离的腔。在哺乳类，体腔又细分成分别包裹胸、心脏和腹部的胸腔膜、围心腔和腹膜腔。产生中胚层体节和身体衬里的机制在整个脊椎动物的进化中几乎没有改变，鸡胚中胚层的发育可与蛙胚的类似时期相比较(图 5.15)。

1. 胚外膜的形成

在爬行类、鸟类和哺乳动物中，胚胎发育出现了新变化。爬行类进化出一种机制，把卵产到干燥的陆地上，使它们能自由地探寻远离池塘的生境(niche)。爬行类胚胎发展四套胚外膜，用以调节胚胎和环境之间的关系，实现在干燥陆地发育。虽然多数哺乳动物进化出胎盘，取代蛋壳，但胚外膜的基本图式仍保持未变。在正在发育的爬行类、鸟类和哺乳动物中，胚胎本身和胚外区域之间起初并无明显差别。但随着胚体逐渐成形，边缘上皮不均等分裂，产生体褶(body fold)，把胚胎和

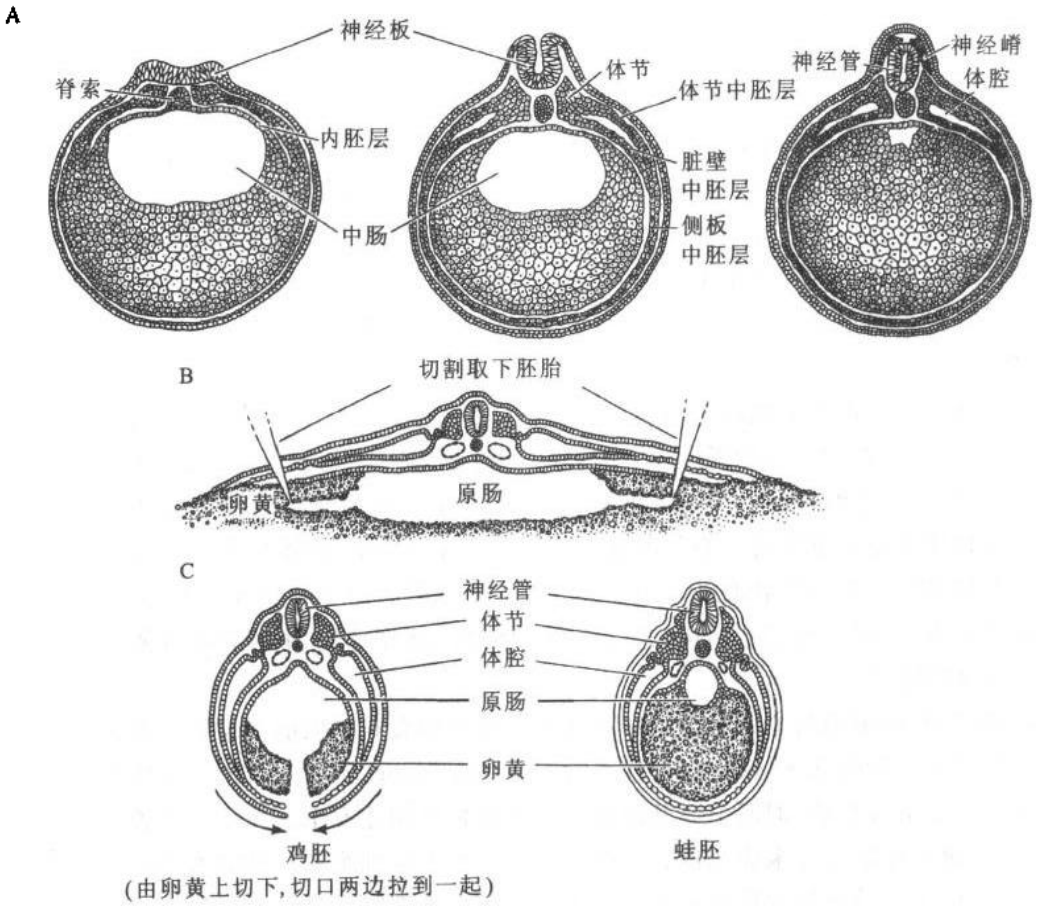


图 5.15 蛙胚和鸡胚中胚层发育比较

A. 蛙类神经胚,示中胚层和体腔的渐进发生 B. 鸡胚横切面 C. 把鸡胚从卵黄上分离下来,将边缘拉到一起,便形成与蛙胚十分相似的神经胚

卵黄分开,并勾画出胚胎本身和胚外结构的轮廓。

体褶是由位于中胚层上的外胚层和内胚层上皮扩展而成的。外胚层和中胚层混合体常被称为体壁层(somatopleure),形成羊膜(amnion)和卵膜(chorion membrane);内胚层和中胚层混合体被称为脏壁层(splanchnopleure),形成卵黄囊(yolk sac)和尿囊(allantois)。内胚层或外胚层组织作为功能性上皮细胞发挥作用,而中胚层的功能则是形成进出内胚层和外胚层上皮的血液。

产于陆地的卵子遇到的第一个问题是干燥。如果不存在适当的水环境,胚胎细胞会很快干死。羊膜即提供了这样一种环境。羊膜细胞分泌羊水,因此,产于陆地的卵其胚胎仍然在水中发生。这个进化是如此有意义,以至于爬行类、鸟类和哺乳动物都利用这种结构进行发育,并因此被归入一大类,即羊膜类脊椎动物。第二个问题是气体交换。这是通过卵膜即最外层胚外膜实现的。在爬行类和鸟类中,卵膜粘到蛋壳上,使卵和环境之间能进行气体交换,而在哺乳类,如前所述,卵膜已进化成胎盘。胎盘除呼吸作用外还有其他的功能。

尿囊存贮尿废物并调节气体交换。在爬行类和鸟类中,尿囊变成一个大囊,为正在发育的胚胎提供保存有毒新陈代谢副产物的场所。尿囊膜的中胚层常和卵膜的中胚层接触,并与之融合,产生绒膜尿囊膜(chorioallantoic membrane)。绒膜尿囊膜有极其丰富的血管,对于鸡胚发育至关重要,

它负责把钙从蛋壳输送到胚胎中,用于骨形成。在哺乳类中,尿囊大小和胎盘排出含氮废料的效率高低有关。在人类,尿囊仅是一个残存的囊,而在猪则是一个体积大且功能重要的器官。

卵黄囊是形成的第一个胚外膜,它为正在发育的爬行类和鸟类胚胎输送营养。卵黄囊由内胚层细胞在卵黄上生长,并把卵黄包裹起来,通过一个开放管道即卵黄导管(yolk duct)与中肠相连接。所以,卵黄囊壁和消化管壁是连续的。在脏壁中胚层内的血管把营养物质从卵黄输送到胚体。胚体并不直接通过卵黄管吸收卵黄。但是,内胚层细胞能把蛋白质降解成可溶性氨基酸,而氨基酸能进入卵黄囊周围的血管。维生素、离子和脂肪酸等其他养分存贮于卵黄囊中,并被卵黄囊输送到胚胎循环系统中。通过这些方式,四种胚外膜使胚胎能在陆地正常发育。

2. 心脏

形成循环系统是侧板中胚层的最大功能之一。循环系统由心脏、血细胞和复杂的血管系统组成,为正在发育的脊椎动物胚胎提供营养。循环系统是正在发育的胚胎中第一个发挥功能的系统,心脏是第一个发挥功能的器官。脊椎动物的心脏起源于脏壁中胚层的两个区域,这两个区域与邻近组织相互作用决定心脏发育。心脏形成细胞(cardiogenic cell)迁移到腹中线位置,并融合成一个由能收缩的肌细胞构成的管状心脏。管状心脏扭曲后成具有单个心房和单个心室的S形结构。随着心脏继续发育,心室形成层状结构,并以比心房更快的速度增殖,隔膜把心腔隔开,形成瓣膜。

(1) 心原基的融合

在两栖类中,预定的两个心脏发生区最初处于中胚层套膜的最前端位置。在神经胚形成时,两个心脏发生区在胚胎腹部区域聚合,形成普通的心包腔(pericardial cavity)。在鸟类和哺乳类中,心脏也由成对原基融合形成,但两个原基的融合直到发育后期才发生。在这类羊膜脊椎动物中,胚胎呈扁平盘状,侧板中胚层并未完全包裹卵黄囊。其预定心脏细胞在早期原条中发生,具体位置紧随亨氏结之后,向下大约延伸到原条长度的一半。预定心脏细胞通过原条迁移,在亨氏结侧面同一水平面形成两组中胚层细胞(图 5.16)。在 18~20 h 鸡胚中,预定心脏细胞在内胚层和外胚层之间向胚胎中部移动,并与内胚层表面保持紧密接触。当预定心脏细胞到达消化管向胚胎前区延伸的位置时,迁移停止。预定心脏细胞迁移的方向性似乎由内胚层决定。如果转动胚胎心区内胚层的位置,预定心脏中胚层细胞迁移方向就会改变。据认为,内胚层与心区细胞运动有关的成分是由前到后呈梯度分布的纤连蛋白。纤连蛋白抗体能阻止心脏细胞迁移,而其他细胞外基质的抗体则不能阻止心脏细胞迁移。

内胚层还能导致预定心脏细胞发育成心肌。在鸡及两栖类中,前端内胚层能引起非心脏中胚层细胞表达心脏特异性蛋白质。心肌细胞的分化在两个心脏原基细胞彼此相对迁移时独立发生。鸟类和哺乳类的预定心脏细胞形成一个双壁管,里面一层为心内膜(endocardium),外面一层为心肌外膜(epimyocardium)。心内膜形成心脏内层衬里;心肌外膜形成心脏肌肉层,为机体终生泵血。

随着神经胚形成不断进行,脏壁中胚层向内形成皱褶将前肠包裹。脏壁中胚层向内形成皱褶的运动将心脏两个双壁管带到一起,最终心肌外膜合并成一根管。两个心内膜短时间内位于同一腔内,但它们终将融合在一起。至此,原先成对的体腔合并成一个,心脏位于其中。心脏的两侧对称起源可以通过手术阻止侧板中胚层合并来证明。阻止侧板中胚层的合并将导致发生心脏断裂(cardia bifida),即在身体两侧形成分离的心脏。心脏形成的下一步是心内膜管融合,形成单个心房。心内膜管的融合在鸡胚大约发生在第 29 小时,在人则发生在妊娠第 3 周。心内膜后端未融合部分成为卵黄静脉(vitelline veins)进入心脏的通路(图 5.17)。卵黄静脉从卵黄囊输送营养物到静

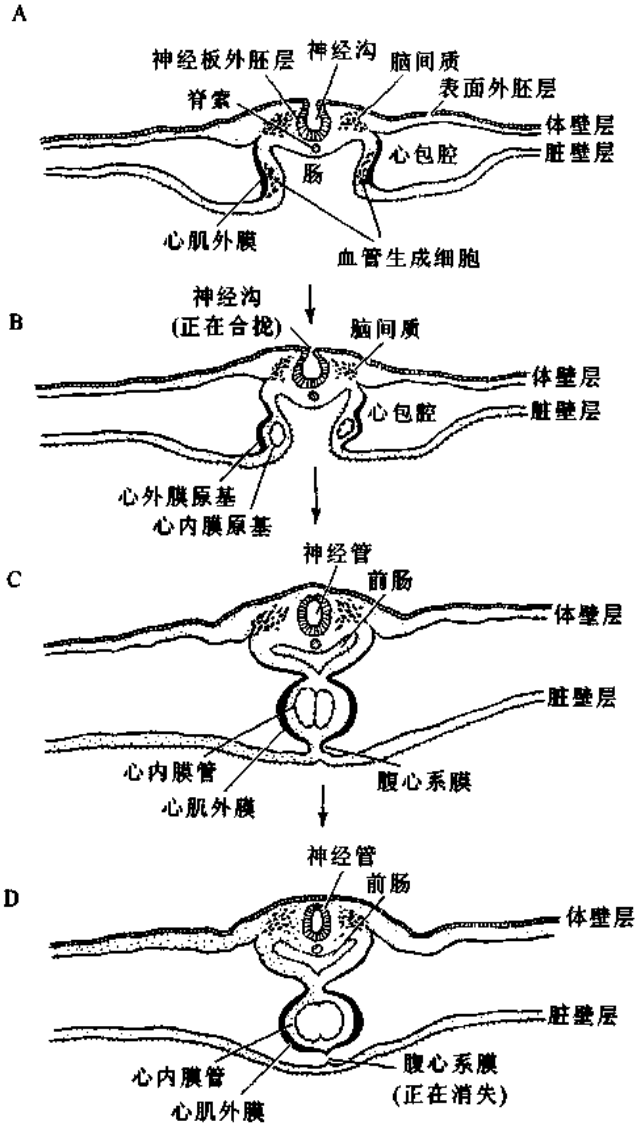


图 5.16 心脏形成

25 h(A)、26 h(B)、28 h(C)和 29 h(D)通过鸡胚心脏形成区的横切面

脉窦(sinus venosus)。血液通过瓣膜进入心脏的心房区(atrial region)。动脉干(truncus arteriosus)的收缩使血液加速流入主动脉(aorta)。

当成对原基还在融合时,心脏已开始搏动。心脏收缩的起搏器是静脉窦。收缩在静脉窦开始,然后肌肉收缩波传播到管状心脏。这样,心脏即使在复杂的瓣膜系统形成之前就能泵血。心肌细胞本身也具有内在节律收缩能力。从第 7 天的大鼠胚胎或鸡胚中分离出来的心肌细胞,在培养皿中仍能继续搏动。在胚胎中,心脏收缩受延髓发出的迷走神经的电位变化调节。鸡胚发育到第 4 天时,其心电图已与成体的相似。

(2) 心腔的形成

在第 3 天鸡胚和第 5 周人胚中,心脏是具有一个心房和一个心室的双腔管。在鸡胚中,肉眼即能看到血液进入较低一个腔内,并由主动脉泵出。当心肌膜细胞产生一种因子(可能是转化生长因

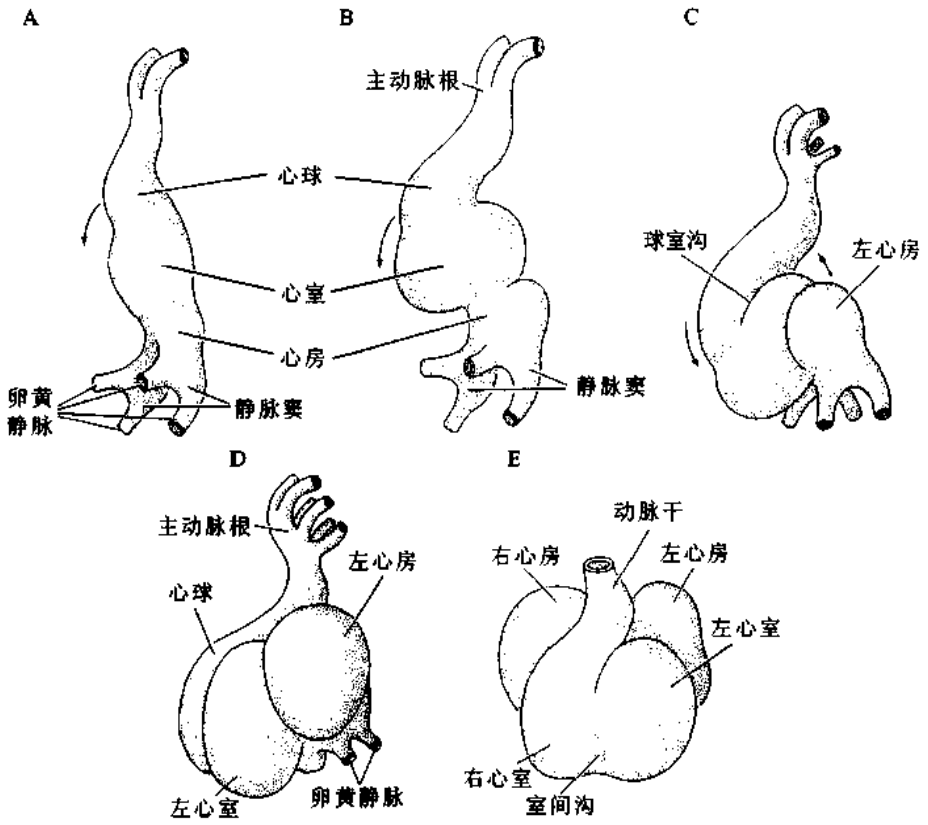


图 5.17 发育第 3 周人胚心腔的形成

心腔由一简单管状结构发育而成。A~D. 正在发育的心脏左面观 E. 正在发育的心脏右面观，从外表看心房已出现区别，但在心脏内部尚未分开。注意：有两个主动脉根，分叉形成主动脉弓

子 β3)导致毗邻的心内膜细胞脱离并进入两者之间含有丰富透明质的心胶质(cardiac jelly)时，心脏双腔管分隔成不同的心房和心室。在人胚中，由心内膜脱离的细胞导致心内膜垫(endocardial cushion)的形成，把心脏双腔管分成左、右房室管。与此同时，原始心房被向腹面心内膜垫生长的两个隔膜分隔开。不过，隔膜上有孔，因此，血液能从一边流向另一边。血液的两边对流对于胎儿在肺功能循环建立之前是必需的。但是，一旦第一次呼吸出现，隔膜上的孔即闭合，左、右循环回路完全建立起来。心室的分隔是由向心内膜垫生长的心室隔膜完成的。伴随着心室分隔(人胚通常在第 7 周出现)，心脏变成 4 个腔的结构，肺动脉连接到右心室，主动脉连接到左心室。

这里有一个问题：心脏开始形成时左右对称，为什么后来出现左右极性？或者说，为什么心脏的左边会不同于右边？对具双左侧或双右侧畸形心脏胎儿的研究表明，脾的存在和心脏的左侧存在关联。多脾(身体左边和右边各有一个脾)与双左侧心脏相联系，而无脾则与双右侧心脏相联系。目前，对心脏出现左右不对称性的机制还不了解。不过，在胚胎发育早期，细胞外基质蛋白弯曲素(flectin)不对称沉淀可能导致心脏的一侧发育有别于另一侧。

3. 血管的形成

(1) 对血管形成的限制

有三种因素能限制血管构建。第一种限制因素是生理性的。新生机体早在发育进行过程中就需要进行正常功能运转，胚胎细胞在消化管形成前就必须获得营养，在肺形成前必须获得氧，在肾

形成前必须排除废物等等。因此,正在发育的胚胎的循环生理不同于成体动物的循环生理,其循环系统存在下述差异:食物不是通过消化管吸收,而是通过卵黄或胎盘吸收;呼吸系统不是通过鳃或肺进行,而是通过卵膜或羊膜进行。因此,胚胎主要血管需要服务于有关胚外结构。

第二种限制因素是进化性的。哺乳类的胚胎虽然没有卵黄,但仍将血管延伸到卵黄囊上。不仅如此,离开心脏的血液在前肠上方构成回路,形成位于背部的主动脉。6 对主动脉弓在咽上方形成回路(图 5.18)。在原始鱼类中,主动脉弓持续存在,使鳃给血液充氧。在成年哺乳类或鸟类,由肺给血液充氧,同样的 6 对主动脉弓存在并没有什么实际意义。但是,鸟类和哺乳类胚胎在最终形成单一主动脉弓前还是形成 6 对主动脉弓。因此,即使身体不需要这样一种结构,但胚胎发育还是反映了进化历史。

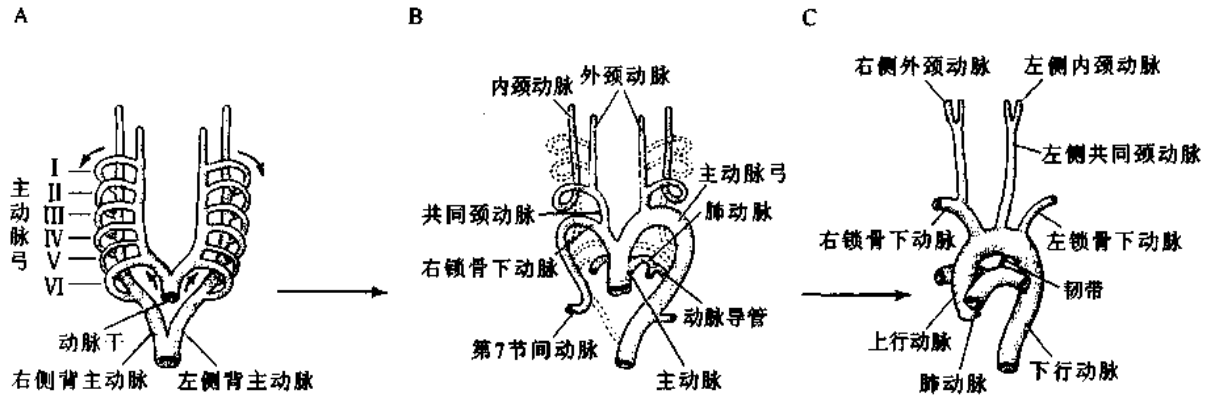


图 5.18 人胚胎动脉弓

A. 开始,动脉干把血液泵入主动脉,主动脉在前肠两边形成分叉,经过 6 对主动脉弓,血液从腹主动脉流入背主动脉
B. 主动脉弓开始退化或重塑。带点线条表示正在退化的结构 C. 最终,保存下来的主动脉弓形态发生变化,形成成体主动脉弓

第三种限制因素是物理性的。根据流体运动定律,流体通过大管传输最有效。随着血管半径 r 越变越小,流动阻力 r^{-4} 逐渐变大(Poiseuille 定律)。如果一个血管的直径只有另一个血管的一半,那么阻力将增加 16 倍。但是,只有当血液缓慢流动并接近细胞膜时,营养的扩散才可能发生。所以,这是一个两难的问题:营养扩散要求血管小,而按水力学定律血液流动要求血管大。有机体通过进化形成大小不同的血管等级系统解决了这个两难问题。血管系统在发育早期就已形成,例如,在第 3 天的鸡胚中就能看到血管。在狗中,大血管(主动脉和腔静脉)血液的流动比在毛细血管快 100 倍。通过大血管专门用于运输,小血管专门用于扩散,营养和氧气都能运达正在发育机体的每个细胞。但是,这还不是全部。如果在常压下液体从一个大管直接流到小管,流速必然增加。针对这一问题,机体进化形成许多分支小血管,所有分支小血管集合形成的横截面积比分支前血管的横截面积大。血管和小血管分支之间的关系用 Murray 定律表示,即母血管半径的立方大约等于子血管半径的立方总和。任何循环系统的构建都是生理限制、物理限制和进化限制协调统一的产物。

(2) 血管形成:血岛血管形成

由中胚层形成血管称为血管形成(vasculogenesis)。在肠、肺和主动脉以及排列在卵黄囊内层的脏壁中胚层中,毛细血管网均在各自组织内单独形成。在这些情况下,毛细血管都不是由心脏形成主血管越变越细伸长的结果,而是由每个器官中胚层所包含的称为成血管细胞(angioblast)的细

胞自身排列形成毛细血管。这些器官特异性毛细血管网最终连接到主血管延伸的小血管上。

在鸡胚中，存在两种成血管细胞。首先，脑轴旁中胚层提供形成头部血管的成血管细胞，而躯干部体节轴旁中胚层包含的成血管细胞则迁移形成体壁、四肢、肾和主动脉背部的血管。第二种成血管细胞来自脏壁中胚层。脏壁中胚层中的成血管细胞移居到内脏器官、肠和主动脉基底部。移居后的成血管细胞实质上是血管和血细胞生成细胞(hemangioblast)，不仅产生血管内皮衬里，而且提供血细胞前体。

脏壁中胚层细胞的侵入是羊膜发育关键一步，因为沿卵黄囊成簇排列的血管生成细胞即血岛(blood island)形成卵黄(脐肠系膜)静脉，向胚体输送营养，并负责气体进出交换(图 5.19)。在鸡胚头褶发生阶段，即原条充分延伸的时候就能在暗区中看到血岛细胞。它们排成细胞索，很快空泡化成为类似于心脏的双壁管：内壁细胞变成血管的扁平内皮细胞；外壁细胞变成平滑肌。在衬里和平滑肌两层壁间是基膜，包含某些血管特异性胶原。据认为，基膜能启动血管中细胞分化为不同类型。血岛中央的细胞分化成胚胎血细胞。随着血岛生长，它们最终融合形成毛细血管网，逐渐消失于卵黄静脉中，而卵黄静脉把食物和血细胞输运到新形成的心脏中。

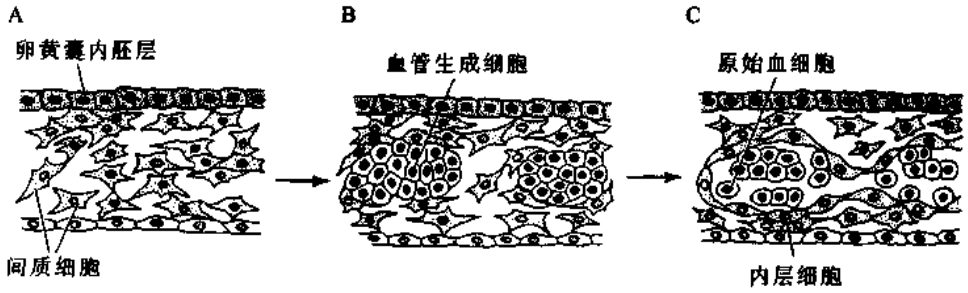


图 5.19 血管形成

血管形成首先见于卵黄囊壁上，那里未分化间质细胞(A)形成血管形成细胞簇(B)血管形成细胞簇中央细胞形成血细胞，外层细胞形成血管内皮细胞(C)

有三种生长因子可能参与启动血管形成。第一种是碱性成纤维细胞生长因子(FGF2)，为中胚层细胞形成成血管细胞所必需。鹌鹑胚盘细胞分散培养，不会形成血岛或内皮细胞。但是，把 FGF2 中加到培养物，不但形成血岛，而且血岛能形成内皮细胞。FGF2 在鸡胚绒膜尿囊膜中合成，并与该组织血管化(vascularization)有关。第二种是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor，VEGF)。VEGF 蛋白好像能特异性地促进成血管细胞分化，并促进成血管细胞分裂增殖，形成内皮管。在血岛和其他 VEGF 活性区域都已发现存在 VEGF 受体。如果小鼠胚胎缺乏编码 VEGF 主要受体，即 Flk1 受体酪氨酸激酶的基因，则卵黄囊血岛就不能形成，血管也不能生成。缺乏 VEGF 第二个受体基因的小鼠，能分化形成内皮细胞和血岛，但这些细胞不能组成血管。第三种是血管生成素(angiopoietin－1)，能调节内皮细胞和平滑肌之间的相互作用。血管生成素或其受体突变导致血管畸形，通常是包围血管的平滑肌有缺陷。

(3) 血管的迅速生长

血管形成并非生成血管的惟一途径。在肢芽、肾和大脑等器官中，现存血管能迅速生长(类似植物发芽一样)，并把内皮细胞送到正在发育的器官中。这种由原先存在的血管增殖而形成新血管的血管形成方式称为血管生长(angiogenesis)。如在前肢肢芽中，毛细血管网由主动脉的细胞迅速

生长形成。在前肢毛细血管网中，中央静脉(后变成下腔静脉)形成主要的供养血管(feeding vessel)。血液由构成前端和后端毛细血管形成的边缘静脉返回到身体(图 5.20)。据认为，前肢器官形成区分泌血管生成因子，促进器官形成区内皮细胞的有丝分裂，并迁移到器官形成区。VEGF 也能促进内皮细胞从器官表面现存血管中迁移到前肢器官中。四肢血管化程度和肢芽中 VEGF 水平相关，VEGF 表达的时空模式与血管进入肾和大脑的时间和地点非常一致。

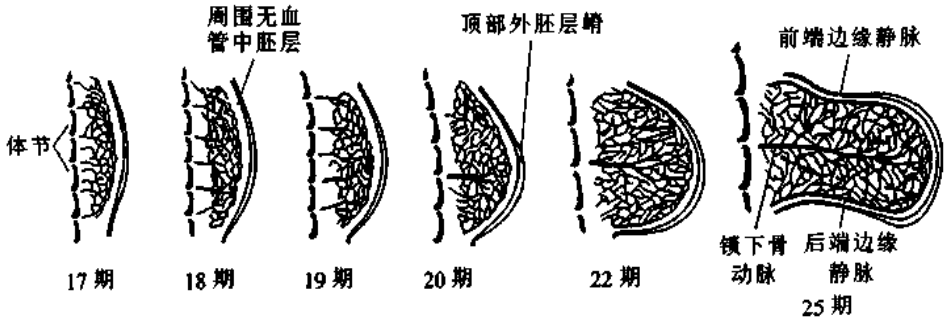


图 5.20 鸡胚翅芽早期发育时血管系统的形成

有些器官可以自己制造血管生成因子。胎盘的功能依赖于现存血管改变路线返回本身。当胎盘形成之初，它分泌增殖素(proliferin，PLF)诱导血管生成。PLF 是一种类似于生长素的因子。当胎盘血管建立起来(小鼠是 12 天之后)时，胎盘分泌增殖素相关蛋白(proliferin - related protein，PRD)，即一种抑制血管生长的多肽。正在发育的骨骼是另一种将血管改变路线返回本身的器官。如前所述，除毛细血管侵入生长板，将软骨转化成骨之外，软骨一般是一种无血管组织。肥大软骨(成熟或正在分裂的软骨除外)分泌一种 M_r 1.2×10^5 的血管生长因子。有趣的是，只有当早期肥大软骨细胞暴露到维生素 D 时，才合成 M_r 1.2×10^5 血管生长因子。这可能有助于说明佝偻病病人的骨骼变形。

血管生长对任何组织的生长，包括肿瘤的生长都是至关重要的。肿瘤只有在使血管改变方向进入自身时，才是“成功”的肿瘤，因此，肿瘤分泌血管生长因子。抑制血管生长因子的形成极可能有助于阻止肿瘤生长和转移。

(4) 胚胎血循环

进出鸡胚及其卵黄囊的胚胎循环系统如图 5.21 所示。由背主动脉泵来的血液通过主动脉弓下行进入胚胎。其中，有些血液通过卵黄静脉离开胚胎进入卵黄囊。营养物质和氧气被吸收后，血液通过卵黄静脉返回，由静脉窦到心脏。哺乳类胚胎中从胎盘获得营养物质和氧气。因此，尽管哺乳类胚胎有类似卵黄静脉的血管，但营养物质和氧的供应主要来自将胚胎与胎盘连接的脐静脉(umbilical vein)(图 5.22)。在鸟类，将含氧和含营养物血液送回胚胎的脐静脉由右卵黄静脉衍生来，而将废物带回胎盘的脐动脉(umbilical artery)则由尿囊动脉衍生来。脐动脉从主动脉尾部伸出，沿尿囊行进，然后进入胎盘。

血液进入哺乳动物胚胎心脏之后，被泵进包绕咽部并将血液带到背部的一系列动脉弓中。哺乳动物第 4 对动脉弓的左支是惟一残存到达主动脉的动脉弓，其右支变成下腔动脉的根部。第 3 对动脉弓改变形成共同的颈动脉，为大脑和头部供应血液。第 6 对动脉弓改变形成肺动脉，而第

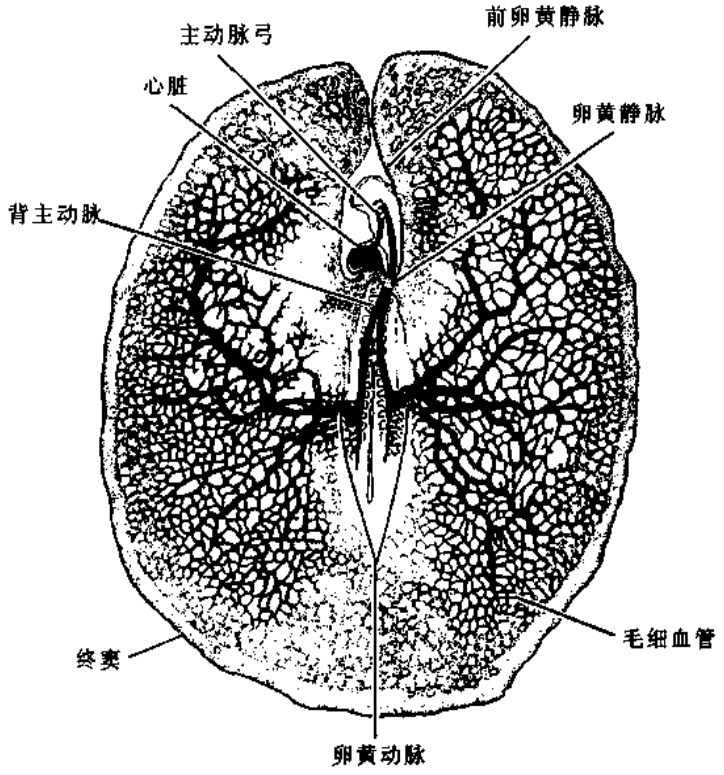


图 5.21 44 h 鸡胚循环系统腹面观，示主动脉(黑色)和静脉(画点部分)
终窦是 44 h 鸡胚循环系统的最外围，也是血细胞形成处

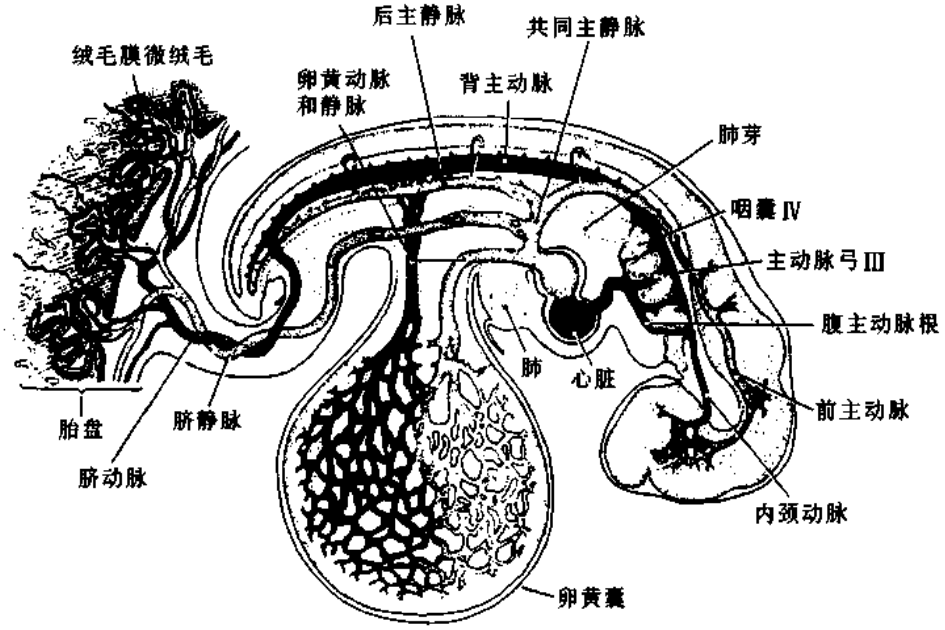


图 5.22 第 4 周人胚的循环系统
虽然此时人胚所有主要血管左右成对，但图中只给出右侧血管。主动脉以黑色表示

1、2、5 对动脉弓退化。因此，主动脉和肺动脉在胚胎发育大部分时间都具有一个共同的开口通向心脏。最后，在动脉干中形成隔膜，产生两个不同的血管。只有当新生命出现第一次呼吸，象征肺已能够处理血液充氧作用时，心脏才发生改变，把血液分别泵到肺动脉和主动脉。

三、血细胞的发育

1. 干细胞的概念

体内很多细胞仍然保持胚胎细胞特性，能不断增殖。如身体内每天丢失并替补的红细胞和小肠细胞大约 10^{11} 个，都来自干细胞群。干细胞是能够大量增殖，产生更多的干细胞(自我更新)和更多的分化细胞的细胞。实际上，干细胞是胚胎细胞群，它们在成年机体内连续不断地经历进一步的发育变化。血细胞、小肠隐窝细胞、上皮和雄性精母细胞都是细胞形成与细胞丢失处于平衡态的细胞类群。在大多数情况下，当平衡受到损伤或环境胁迫时，干细胞能调整产生更多的干细胞或产生更多的分化细胞(这可由身体缺氧时产生大量红细胞观察到)。干细胞存在于前面提到的所有组织中，但是，最容易研究且研究最多的干细胞是血细胞的发育。

有些干细胞锁定在 G_0 期，是非周期性潜在的干细胞，而另一些干细胞则处于活跃的细胞周期中。处于细胞周期的干细胞通常分裂产生更多的干细胞，但它们也能产生过渡性的中间态干细胞类型(T1)。T1 细胞自己能再生，但通常产生第二种类型的过渡性细胞 T2(在某些情况下，如干细胞群严重减少，T1 干细胞能形成原来的干细胞)。T2 细胞也能再生，但通常分裂产生 T3 细胞。最终，过渡性细胞类型变成总是形成分化细胞的细胞类型。因此，脊椎动物身体保留干细胞群，它们既能产生更多的干细胞又能产生进一步经历发育变化的细胞类群。

干细胞后代进入的发育途径依赖于它所处位置的分子环境。有证据显示：红细胞、白细胞和血小板，以及淋巴细胞具有共同的前体——多能造血干细胞(pluripotential hematopoietic stem cell)。

2. 多能造血干细胞和造血微环境

(1) CFU－S

多能造血干细胞是给人以深刻印象的细胞之一。它可以产生白细胞(中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞)、血小板、肥大细胞、单核细胞、巨噬细胞、成骨细胞和 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞。Till 和 McCulloch 于 1961 年证实了多能造血干细胞的存在。他们将骨髓细胞注射到经致死剂量照射的同一品系小鼠中(照射杀死宿主的造血细胞，以便能观察到供体小鼠中断的细胞群)，发现供体的某些细胞在受体小鼠脾中形成明显的结节。显微观察表明，这些结节是由红细胞、粒细胞和血小板前体组成。因此，来自骨髓的单个细胞能够形成许多不同类型的血细胞。能担负起这种功能的细胞称为 CFU－S，即脾细胞群落形成单元(colony－forming unit)。染色体标记研究进一步证明，群落内不同类型的细胞由相同的 CFU－S 形成。首先，骨髓细胞照射后基本不能存活，而存活下来的许多细胞具有异常染色体，可用显微镜辨别。当经过照射的 CFU－S 细胞被注射到造血干细胞已被毁坏的小鼠中时，脾细胞群落的每一个细胞，不论是粒细胞还是红细胞前体，都具有同样异常的染色体。干细胞概念的一个重要内容是要求干细胞除形成分化细胞外，还能够形成更多的干细胞。实际情况的确如此。当单个 CFU－S 衍生的脾群落悬浮液注射到另一只小鼠时，出现许多脾细胞群落。因此，显而易见，单个骨髓细胞不但能形成大量不同类型的细胞，而且还能够自我更新。换言之，CFU－S 是一个多能的造血干细胞。

前述数据表明，尽管 CFU－S 能产生许多类型的血细胞，但它不能形成淋巴细胞。Abramson 等(1977)证明，CFU－S 和淋巴细胞都来自另一种多能造血干细胞 CFU－M,L，即骨髓淋巴细胞群落形成单元。把照射过的骨髓细胞注射到血细胞形成有遗传缺陷的小鼠中，发现脾群落细胞和正在循环的淋巴细胞显示同样的染色体异常。再者，把病毒注射到骨髓细胞中，它便随机地整合到细胞 DNA 中，结果发现，同样的病毒基因存在于淋巴细胞和血细胞基因组相同区域中。Berardi 等(1995)分离出一部分可能是人类的 CFU－M,L 细胞。分离的细胞用细胞分裂素(cytokine)处理诱导分裂，再把分裂细胞全部杀死。最后，在最初每 10 000 个骨髓细胞中可以获得 1 个有核细胞。这些细胞既能形成血细胞谱系，又能形成淋巴细胞谱系。

(2) 血细胞及淋巴细胞系

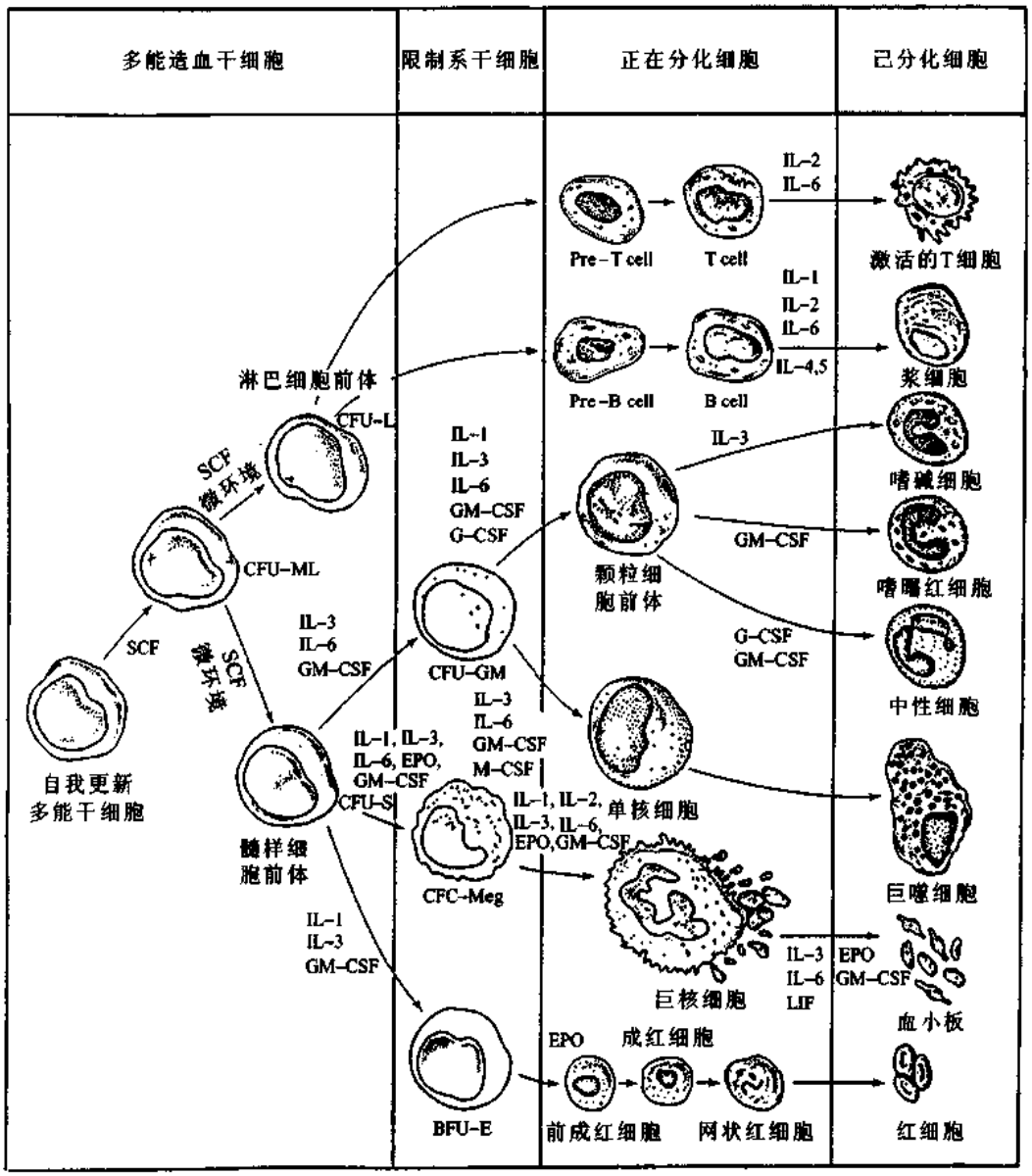


图 5.23 哺乳类血细胞和淋巴细胞的起源模型

EPO. 红细胞生成素 G-CSF. 粒细胞群落刺激因子 GM-CSF. 粒细胞-巨噬细胞群落刺激因子 IL. 白细胞介素 LIF. 白细胞介素抑制因子 M-CSF. 巨噬细胞群落刺激因子 SCF. 干细胞因子

图 5.23 示有关研究结果综合。最早的多能造血干细胞是 CFU-M,L。CFU-M,L 的发育取决于转录因子 SCL。缺少 SCL 蛋白的小鼠将死于血细胞及淋巴细胞缺乏。SCL 可能决定腹部中胚层发育成血细胞,或者与 CFU-M,L 细胞的形成和维持有关。CFU-M,L 细胞能产生 CFU-S 细胞(血细胞)和 CFU-L 细胞(淋巴细胞)。CFU-S 和 CFU-L 也是多能干细胞,因为它们的后代能分化成大量不同类型的细胞。不过,CFU-S 形成的直接后代是限制系(lineage-restricted)干细胞,每个细胞除更新自己外只能产生一种类型的细胞。例如,幼红细胞突发形成单元(burst-forming unit, BFU-E)是从 CFU-S 形成的。除复制自己以外,BFU-E 只能形成一种类型细胞,即幼红细胞群落形成单元 CFU-E。CUF-E 能对激素促红细胞生成素(erythropoietin)发生反应,形成红细胞

系最早可识别的分化细胞前成红细胞(proerythroblast)。促红细胞生成素是一种糖蛋白,能迅速诱导珠蛋白 mRNA 合成。促红细胞生成素主要在肾产生,其合成对环境条件敏感。如果血液含氧量下降,促红细胞生成素合成便增加,结果导致产生更多的红细胞。随着前红细胞成熟,它变成成红细胞(erythroblast),合成大量血红蛋白。最终,哺乳动物成红细胞把细胞核排出,成为网状细胞(reticulocyte)。网状细胞不能再合成珠蛋白 mRNA,但还能将现有珠蛋白 mRNA 翻译成珠蛋白。分化的最后阶段是红细胞(erythrocyte)阶段。在最后阶段,既无细胞分裂,又无 RNA 合成和蛋白质合成,红细胞离开骨髓,承担运送氧到周身组织的功能。同样,也存在血小板限制系干细胞和粒细胞(中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞)以及巨噬细胞限制系干细胞。

有些造血生长因子(如 IL-3)可以刺激较原始干细胞的分裂和成熟,因此使所有类型的血细胞数量增加。另一些生长因子(如红细胞生成素)则只能刺激特定的细胞系细胞分裂和成熟。细胞对生长因子发生反应的能力取决于细胞表面是否存在生长因子受体。一般来说,受体含量都很低。CFU-E 每个细胞表面大约只有 700 个促红细胞生长素受体分子,其他干细胞表面生长因子受体分子数量都差不多。但是,巨噬细胞群落刺激因子(colony-stimulating factor)M-CSF(也称为 CSF-1)的受体是个例外,每个干细胞细胞表面受体分子可达 73 000 个。

(3) 诱导造血微环境

有些造血生长因子是由骨髓自身的基质细胞(成纤维细胞和其他结缔组织细胞)产生的。另一些生长因子通过血液循环,被基质细胞的细胞外基质所截留。在脾中,干细胞主要定型发育成红细胞。在骨髓中,粒细胞发育占优势。多能干细胞的后代所采取的发育路径取决于它们所遇到的生长因子,而这又由骨髓基质细胞决定。基质细胞和干细胞之间的短程相互作用决定干细胞子代的发育命运。Wolf 和 Trentin 于 1968 年把骨髓栓(plugs of bone marrow)放到脾中,再注射干细胞,发现脾形成的群落主要是幼红细胞,骨髓栓中形成的群落主要是粒细胞,而跨越边界两边的群落明显地表现出位于脾中的是幼红细胞,位于骨髓中的是粒细胞。决定幼红细胞和粒细胞发育命运的区域称为诱导造血微环境(hematopoietic inductive microenvironment,HIM)。

骨髓基质细胞和造血生长因子结合创造出诱导造血微环境。粒细胞和巨噬细胞群落刺激因子(GM-CSF 以及多系(multilineage)生长因子 IL-3 两者都能和骨髓基质的硫酸乙酰肝素氨基葡聚糖结合。不仅如此,生长因子在结合之后仍有活性。这样,生长因子便分隔浓集于一个区域内,刺激干细胞来分化形成同一种类型细胞,而另一个区域相同的干细胞则分化成另一种类型的细胞。没有生长因子,干细胞也就死亡。

3. 破骨细胞发育

如前所述,干细胞受大量造血生长因子影响。然而,生长因子本身又受身体激素环境影响。这对绝经后发生的骨质疏松(menopausal osteoporosis)尤为重要。许多雌性哺乳动物卵巢功能的丧失引起骨质流失,服用雌激素可以防止骨质流失。绝经后的骨质流失和破骨细胞分裂增加有关。据认为破骨细胞、巨噬细胞及粒细胞共同来源于同样的干细胞 CFU-GM。生长因子白细胞介素 6(interleukin 6,IL-6)能刺激破骨细胞形成。不过,IL-6 的产生能被雌激素抑制。当把雌激素添加到培养的小鼠骨髓细胞中,IL-6 和破骨细胞的产生均被抑制。Jilka 等(1992)证明,切除小鼠卵巢导致 CFU-GMs 数量增加,促进破骨细胞发育,因而骨中破骨细胞数量也增加。所有这些变化可以通过给小鼠注射雌激素或 IL-6 抗体而避免。这表明雌激素能抑制雌性哺乳动物 IL-6 的产生和破骨细胞的形成,绝经后骨质流失可能是由 IL-6 介导产生新的破骨细胞所致。

4. 造血位点

在鸟类和两栖类中,最初的血细胞来源于卵黄或卵黄囊。来源于卵黄和卵黄囊的细胞群是临时性的,而终生存在的造血干细胞则来源于主动脉周围的中胚层区域。Dieterlen-Lievre 和 Martin(1981)通过一系列漂亮的实验证明了这一点。他们把鸡胚胚盘移植到鹌鹑(鹌鹑细胞的核仁比鸡的致密,故鹌鹑细胞核染色较浓,两者很容易区别)卵黄上,发现卵黄囊干细胞并不形成成体动物的血细胞,成体动物真正的干细胞在排列于肠系膜和主血管壁的中胚层结节中形成。在 4 天鸡胚中,主动脉壁显然是新的血细胞最重要的来源,其中包含大量的造血干细胞。

在哺乳动物中,造血位点尚不明了,但可能与鸟类非常相似。小鼠胚胎中最初的血岛出现在胚外中胚层和卵黄囊中胚层。血岛中的血细胞具有 CFU-C 活性。来源于卵黄囊的血细胞群可能是临时性的,或仅仅满足胚胎呼吸需求(产生有核红细胞)。到第 11 天,多能造血干细胞和 CFU-S 细胞出现于小鼠胚胎,包括主动脉、生殖腺和

中肾(AGM 区域)在内的中胚层区域。出现于这些区域的多能造血干细胞和 CFU－S 细胞就是血细胞前体,它们将移居到肝中,并形成胎儿和成体循环系统。大约在出生时,来自肝的干细胞迁移到骨髓中,成为终生的血细胞主要形成场所。

第三节 内 胚 层

一、咽

胚胎内胚层的功能是构建体内两根管道的衬里。第一根管道是贯穿于身体全长的消化管。肝、胆囊和胰腺即由此管凸出形成。第二根管道即呼吸管,由消化管向外生长形成,它最终分叉形成肺。消化管和呼吸管在胚胎前端区域具有共同的腔室。消化管和呼吸管具有共同腔室的区域称为咽(pharynx)。咽向外凸起形成的上皮外囊(outpocket),产生扁桃体、甲状腺、胸腺和甲状旁腺。

呼吸管与消化管均起源于原肠。随着内胚层向胚胎中央挤压,出现前肠和后肠区域。起初口端由被称为口板(oral plate)或原口(stomodeum)的外胚层堵塞。最终(人大约在胚胎发育 22 天后)原口破裂,从而形成消化管开口。这个开口本身由外胚层细胞衬里。这种排列很有趣,因为口板外胚层与大脑外胚层接触,而大脑外胚层向胚胎腹部弯曲。这两个外胚层区域彼此相互作用,口区顶盖形成颅颊囊(Rathke's pocket),并成为垂体的腺垂体部分,间脑底部的神经组织形成漏斗状突起,成为垂体的神经垂体部分。因此,垂体具有双重起源,垂体的成体功能也明显反映出其双重起源性。

消化管和呼吸管的内胚层部分开始于咽。在咽部,哺乳动物胚胎产生 4 对咽囊(pharyngeal pouches),咽囊已改变适用于陆生环境。在水生脊椎动物中,咽囊结构产生鳃。如前所述,头部神经嵴细胞移居到咽囊中,形成软骨或间充质部分。咽囊之间是咽弓(pharyngeal arches)。第 1 对咽囊变成中耳的听腔及其相连的咽鼓管,第 2 对咽囊形成扁桃体壁,第 3 对咽囊衍生成胸腺,在后期发育过程中决定 T 细胞分化,第 3 对咽囊还形成一对甲状旁腺,而另一对甲状旁腺则是从第 4 对咽囊产生的。除咽囊之外,咽底部的第 2 对咽囊之间还形成一个小的中央盲管。这个由内胚层和间充质构成的盲管从咽部凸出,向下迁移到颈部,形成甲状腺。

二、消化管及其衍生物

在咽后部,消化管紧缩形成食管,其后依次为胃、小肠和大肠。内胚层细胞只产生消化管的衬里及其腺体,而中胚层间充质细胞包围消化管,产生用于蠕动(peristalsis)的肌肉。

胃由靠近咽部膨大区域发育而成。胃后形成肠。最终,肠和卵黄囊之间的连接断开。在小肠的尾侧,内胚层和上面覆盖的外胚层相遇之处形成一个凹陷。在凹陷中,有一层薄的泄殖腔膜将内胚层和外胚层两种组织分开。凹陷最终破裂,形成肛门的开口。

1. 肝、胰腺和胆囊

内胚层还形成紧位于胃后的三种附属器官的衬里。肝盲囊是从前肠向周围间充质中伸出的内胚层管。间充质诱导内胚层细胞增殖、分支并形成肝的腺上皮。肝盲囊的一部分(最靠近消化管的区域)作为肝的引流管继续行使功能。由引流管产生一个分支形成胆囊。

胰腺由背部盲囊和腹部盲囊融合形成。背部盲囊和腹部盲囊两种原基由紧位于胃后的内胚层产生。随着两个盲囊生长,它们越来越靠近并最终融合。在人类,只有腹部的导管存留,把消化酶运送到小肠,在其他动物(如狗),背部和腹部导管均通入小肠。和其他内胚层器官一样,胰腺是通过上皮及其相邻的间充质相互作用而形成。这两种组织都存在一个由位置决定的特征。如果胰腺上皮放在缺乏中胚层的环境中培养,它几乎完全分化成分泌胰岛素和胰高血糖素的胰岛细胞,不产生胰泡(分泌胰凝乳酶或淀粉酶)或导管结构。这表明胰腺上皮的"未受诱导"状态是产生内分泌激素,消化(外分泌)功能特有的分泌细胞和导管的形成则是胰腺上皮与间充质相互作用的结果。*pdx*－1 基因似乎能使胰腺上皮对间充质作出反应。不具有 *pdx*－1 基因的小鼠缺乏胰腺,尽管其上皮的确分化成合成少量胰高血糖素和胰岛素的前胰岛细胞。因此,胰腺上皮具有自主内分泌能力,只有与间充质相互作用后才能形成外分泌细胞,以及把分泌物送到十二指肠的导管。

2. 呼吸管

肺虽然不起任何消化作用,但却是消化管的衍生物。在咽底部中央第 4 对咽囊之间,喉气管沟(laryngotrachcal groove)向腹部延伸。然后,喉气管沟分支形成两个管,其中一个形成一对支气管,另一个形成肺。喉气管内胚层成为气管、两个支气管和肺泡囊(肺泡)的衬里。这些内胚层管的分支取决于它与不同类型的中胚层细胞相互作用。

肺在进化上是一种较新的结构,是哺乳动物器官中分化最充分的器官。肺在婴儿进行第一次呼吸时,必须能吸收氧。肺泡细胞向浸润肺的液体中分泌一种表面活化剂(surfacant),以保证婴儿第一次呼吸时就能吸进氧。表面活性剂由鞘磷脂和卵磷脂等磷脂组成,在妊娠末期才分泌,一般在妊娠第 34 周左右才达到生理上的有效水平。表面活性剂能使肺泡相互接触而不粘在一起。因此,早产儿通常呼吸困难,不得不被放在呼吸器中直到产生表面活性剂的细胞成熟。

参考文献

1 Abramson S, *et al*. The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. J. Exp. Med., 1977,145: 1 567～1 579

2 Alini M, *et al*. A novel angiogenic molecule produced at the time of chondrocyte hypertrophy during endochondral bone formation. Dev. Biol.,1996, 176: 124～132

3 Berardi A C, *et al*. Functional characterization of human hematopoietic cells. Science ,1995,267: 104～108

4 Catala M, *et al*. Organization and development of the tail bud analyzed with the quail－chick chimaera system. Mech. Dev. ,1995,51: 51～65

5 Conlon R A, *et al*. Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. Development ,1995,121: 1 533～1 545

6 Cossu G, *et al*. How is myogenesis initiated in the embryo? Trends. Genet.,1996, 12: 218～223

7 Cserjesi P, *et al*. A basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. Development,1995, 121: 1 099～1 110

8 Davis S, *et al*. Isolation of angiopoietin－1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion trap expression cloning. Cell, 1996,87: 1 161～1 169

9 Dieterlen－Lièvre F, Martin C. Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. Dev.

Biol.,1981, 88: 180～191

10 Fong G H, *et al*. Role of the Flt－1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. Nature, 1995, 376: 66～70

11 Hall B K. The embryonic development of bone. Am. Sci.,1988, 76: 174～181

12 Hall B K, Miyake T. Divide, accumulate, differentiate: Cell condensations in skeletal development revisited. Int. J. Dev. Biol.,1995, 39: 881～893

13 Jilka R L, *et al*. Increased osteoclast development after estrogen loss: Mediation by interleukin－6. Science,1992, 257: 88～91

14 Jones P H, Watt F M. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells of the basis of differences in integrin function and expression. Cell ,1993,73: 713～724

15 Mancilla A, Mayor R. Neural crest formation in *Xenopus laevis*: Mechanisms of Xslug induction. Dev. Biol.,1996, 177: 580～589

16 Medvinsky A, Dzierak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. Cell ,1996,86: 897～906

17 Nilsson A, *et al*. Regulation by growth hormone of number of chondrocytes containing IGFI in rat growth plate. Science ,1986,233: 571～574

18 Offield M F, *et al*. PDX－1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodnum. Development,1996, 122: 983～995

19 Ordahl C P, Le Douarin N. Two myogenic lineages within the developing somite. Development,1992, 114: 339～353

20 Porcher C, *et al*. The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal－1 is essential for development of all hematopoietic lineages. Cell,1996, 86: 47～57

第二篇

细胞命运特化和胚轴形成

第六章　细胞的自主特化：形态发生决定子

动物有机体是由分化细胞组成的。分化细胞不仅形态多样，而且功能各异。例如，红细胞和白细胞形态与功能不仅彼此不同，而且与推动它们运行周身的心脏细胞的形态与功能也不同。表6.1列出部分已分化细胞的类型、特征产物及其功能。

表 6.1　部分已分化细胞的类型、特征产物及其功能

细胞类型	特征产物	功　能
角质细胞(表皮细胞)	角蛋白	保护身体免受损伤及防止干燥
红细胞	血红蛋白	输送氧气
晶体细胞	晶体蛋白	传送光线
B-淋巴细胞	免疫球蛋白	合成抗体
T-淋巴细胞	细胞表面抗原(淋巴因子)	破坏外源细胞；调节免疫反应
黑素细胞	黑色素	产生色素
胰岛细胞	胰岛素	调节糖类代谢
Leydig 细胞(♂)	睾酮	雄性特征
软骨细胞	硫酸软骨素；胶原纤维 II	腱和韧带
成骨细胞	骨基质	支撑骨骼
肌肉细胞	肌动蛋白和肌球蛋白	肌肉收缩
肝细胞	血清白蛋白；多种酶类	产生血清白蛋白；多种酶类功能
神经元	神经递质(乙酰胆碱、肾上腺素等)	传导电刺激
鸡输卵管管状细胞(♀)	卵清蛋白	产生保护胚胎并为之提供营养的卵清蛋白
昆虫输卵管滤泡细胞(♀)	卵壳蛋白	产生保护胚胎的卵壳蛋白

第一节　细胞定型和分化

从单个全能的受精卵产生各种类型细胞的发育过程叫细胞分化(cell differentiation)。已分化细胞不但具有一定形态和合成特异性产物，而且行使特定的功能。细胞在分化之前，将发生一些隐避的变化，使细胞朝特定方向发展，这一过程称为定型(commitment)。已定型细胞和未定型细胞从表型上看不出任何不同，但前者发育已受到严格限制。胚胎学家通常用决定(determination)一词描述定型这一隐避的过程。不过，胚胎学家使用的"决定"一词意义并不严格。由于分析方法的不同，一个特定组织有时是已决定的组织，有时又是未决定的组织。因此，Slack(1991)建议用"定型"取代"决定"一词，并把定型分为特化(specification)和决定两个时相。当一个细胞或者组织放在中性环境(neutral environment)如培养皿中可以自主分化时，就可以说这个细胞或组织已经特化了；当一个细胞或者组织放在胚胎另一个部位可以自主分化时，就可以说这个细胞或组织已经决定

了。已特化的细胞或组织的发育命运是可逆的。如果把已特化细胞或组织移植到胚胎不同部位，它就会分化成不同组织。相比之下，已决定的细胞或组织的发育命运是不可逆的。

在细胞发育过程中，定型和分化是两个相互关连的过程。实验胚胎学已经证明：在胚胎早期发育过程中，某一组织或器官的原基(anlage)必须首先获得定型，然后才能向预定的方向发育，也就是分化，形成相应的组织或器官。细胞定型之后，分化的方向变得不可逆转。因此，在细胞分化不可逆这个意义上，定型和决定是同义词。

胚胎细胞的定型有两种主要方式(表 6.2)。第一种方式的细胞定型是通过胞质隔离(cytoplasmic segregation)来实现的。卵裂时，受精卵内特定的细胞质分离到特定的裂球中，裂球中所含有的特定胞质决定它发育成哪一类细胞。因此，细胞命运的决定与近邻的细胞无关。细胞命运的这种定型方式称为自主特化(autonomous specification)，细胞发育命运完全由内部细胞质组分决定。也正因为如此，如果在发育早期将一个特定裂球从整体胚胎上分离下来，它就会形成如同其在整体胚胎中将会形成的结构一样的组织，而胚胎其余部分形成的组织中将缺乏分离裂球所能产生的结构，两者恰好互补。这种以细胞自主特化为特点的胚胎发育模式称为镶嵌型发育(mosaic development)，整体胚胎好像是自我分化的各部分的总和。镶嵌型发育也称自主型发育。

表 6.2 细胞定型方式及其特点

细胞定型方式	自主特化	有条件特化
特点	为多数无脊椎动物所具有	为所有脊椎动物及少数无脊椎动物所具有
	细胞命运由其所获得的卵内特定的细胞质组分决定	细胞命运由细胞之间相互作用决定，细胞的相对位置颇为重要
	卵裂方式不可改变，每个胚胎都产生相同的细胞谱系	卵裂方式可以改变
	裂球发育命运一般不可改变	裂球的命运可改变
	细胞谱系"创始细胞"(founder cell)一般在胚轴两极部分形成	
	细胞特化发生在胚胎细胞大量迁移之前	大量的细胞重排和迁移发生在细胞特化之前或与细胞特化相伴发生
	产生"镶嵌型"发育：细胞不能改变发育命运，不能填补所分离裂球留下的空缺	产生"调整型"发育：细胞可以改变发育命运，填补所分离裂球留下的空缺

第二种方式的细胞定型是通过胚胎诱导实现的。胚胎发育过程中，相邻细胞或组织之间通过相互作用，决定其中一方或双方的分化方向，也就是发育命运。初始阶段，细胞可能具有不止一种分化潜能，但是，和邻近细胞或组织的相互作逐渐限制了它们的发育命运，使它们只能朝一定的方向分化。细胞命运的这种定型方式称为有条件特化(conditional specification)或渐进特化(progressive specification)或依赖型特化(dependent specification)，细胞发育命运取决于其所处的环境条件如邻近的细胞或组织等。对细胞呈有条件特化的胚胎来说，如果在胚胎发育早期将一个裂球从整体胚胎上分离下来，那么剩余的胚胎细胞可以改变发育命运，填补分离掉的裂球所留下的空缺，仍形成一个正常的胚胎。这种以细胞有条件特化为特点的胚胎发育模式称为调整型发育(regulative development)。调整型发育也称为有条件发育或依赖型发育。实际上，任何动物胚胎发育过程中，细胞定型的两种方式在一定程度上都发生作用，只是程度不同而已。一般来说，在多数无脊椎动物胚胎发育过程中，主要是细胞自主特化在发生作用，细胞有条件特化次之；而在脊椎动物胚胎发育过程中则相反，主要是细胞有条件特化在发生作用，细胞自主特化次之。

第二节　形态发生决定子

形态发生决定子(morphogenetic determinant)也称为成形素(morphogen)或胞质决定子(cytoplasmic determinant),其概念的形成源于对细胞谱系的研究。Whitman 于 1878 年对环节动物水蛭(*Clepsine*)细胞谱系和细胞发育命运作过较为完整的描述。他的描述不但是有关细胞谱系的最早描述,而且对细胞谱系研究产生了很大影响。水蛭胚胎卵裂期和囊胚期裂球数目相对较少,并且可以根据大小、形状和位置将裂球彼此区分开来,所以,可以跟踪确定每个细胞的来源及其发育命运。Whitman 证明:① 水蛭胚胎的中胚层胚带(germ band)和神经胚带分别形成肌肉和腹神经索;② 中胚层胚带和神经胚带分别由成中胚层细胞和成神经细胞发育而来;③ 成中胚层细胞和成神经细胞都是由早期胚胎一个中胚层干细胞发育而成。Whitman 的结果表明:肌肉和腹神经索等高度分化的结构是由特定的裂球发育来的;特定的裂球是受精卵根据精确的卵裂方式分裂产生,含有卵子一定区域的细胞质。

和水蛭胚胎类似,海鞘胚胎也只由少数几种类型细胞组成,且容易辨认。Chabry 于 1887 年以海鞘为材料,用裂球分离的方法证明:每个裂球都负责产生幼虫一定的组织;当将特定的裂球分离下来时,由这些裂球负责产生的结构在幼虫中便不复存在。Chabry 还注意到,从海鞘胚胎中分离下来的裂球,虽然已和胚胎其他裂球失去联系,但仍能形成在整体中由它负责产生的结构。因此,海鞘每个裂球都是可以自主发育的,海鞘胚胎好像是由能自我分化的各部分构成的镶嵌体。

当代研究结果表明,海鞘胚胎确实类似于依据卵内贮存信息进行自我分化的镶嵌体。海鞘胚胎卵裂时,不同的细胞接受不同区域的卵细胞质。据认为,不同区域的卵细胞质含有不同的形态发生决定子,能够使细胞朝一定方向分化。某些海鞘卵细胞质不同区域具有不同的颜色。如柄海鞘(*Styela partita*)受精卵的细胞质根据所含色素不同可分为 4 个区域(图 6.1A):动物极部分含透明的细胞质;植物极靠近赤道处有两个彼此相对排列的新月区,一个呈浅灰色的灰色新月区(gray crescent)和一个呈黄色的黄色新月区(yellow crescent);植物极的其他部分含灰色卵黄,为灰色卵黄区。卵子受精分裂时不同区域的细胞质分配到不同的裂球中,非常有利于细胞谱系和细胞发育命运的跟踪。Conklin(1905)通过跟踪柄海鞘裂球的发育命运发现:不同区域的卵细胞质分别与未来胚胎特定的发育命运相联系(图 6.1)。黄色新月区含有黄色细胞质,称为肌质(myoplasm),将来形成肌细胞。灰色新月区含有灰色细胞质,将来形成脊索和神经管。动物极部分含透明细胞质,将来形成幼虫表皮。灰色卵黄区含大量灰色的卵黄,将来形成幼虫消化道。

海鞘第一次卵裂面和幼虫身体左右对称面吻合。以后,两边裂球的发育完全相同。Reverberi 和 Minganti(1946)将海鞘 8－细胞胚胎的裂球分成 4 对(左右两裂球是等同的),发现如同卵子命运决定图谱所预期的一样,植物极后面一对裂球(B4.1)形成内胚层、间质和肌肉组织(图 6.2)。可见,海鞘裂球的发育命运在 8－细胞期已经决定,此时的裂球分离后能够自我分化。不过,神经系统的发育例外。整体胚胎中神经细胞是从动物极前面一对裂球(a4.2)和植物极前面一对裂球(A4.1)产生的。当这两对裂球被分离下来单独培养时都不形成神经组织,可是,两者配合后,又形成脑和触须(palp)组织。由此可见,即使在海鞘这样严格的镶嵌型发育胚胎中,也存在着裂球之间相互作用决定细胞发育命运的渐进决定作用。事实上,Ortolani(1959)证明海鞘外胚层细胞直到

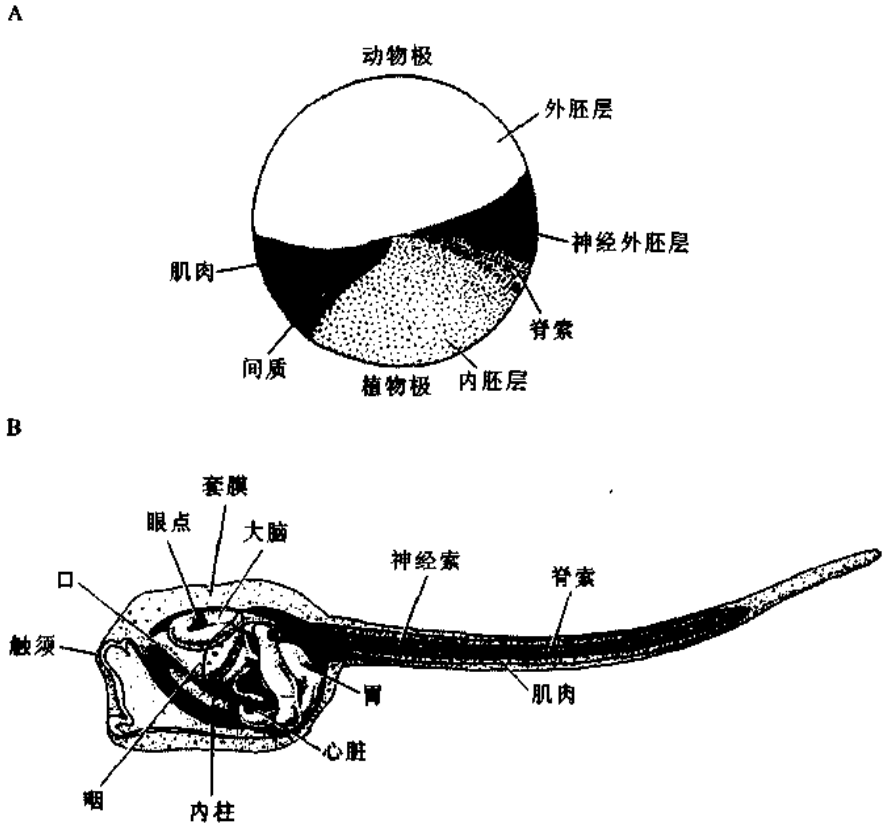


图 6.1 受精时细胞质决定子的隔离

A. 海鞘受精卵细胞质不同区域具有不同的发育命运 B. 海鞘幼虫器官

64－细胞期时尚未定型发育成神经组织。

Whittaker 曾用玻针反复挤压海鞘 B4.1 裂球,使分裂沟退化。随后,在更靠近植物极的区域重新形成分裂沟。用玻针沿新形成的分裂沟将裂球切割下来,部分肌质即黄色新月区胞质便转移到动物极 b4.2 裂球中(图 6.3)。本来预定只形成外胚层的 b4.2 裂球接受肌质后,也能产生肌肉。同样,Deno 和 Satoh 用显微注射方法也证明:B4.1 裂球中的肌质移植到预定非肌细胞后,预定不形成肌肉的细胞也能产生肌肉。由此可见,卵细胞质中存在某些形态发生决定子,能够决定细胞朝一定方向分化,形成一定的组织结构。

我国学者童第周等(1977)完全从另一个角度,也证明海鞘卵细胞质中存在能决定细胞发育命运的形态发生决定子。他们在海鞘卵子受精后 20 分钟,把受精卵一分为二,其中一个无核卵块用作受体,分别把原肠胚或尾芽期幼虫的外胚层、中胚层和内胚层细胞的细胞核移植到受体中。结果发现,无论移植的细胞核来自三胚层中哪一胚层,所形成幼虫的组织结构总是和无核卵块所含有的细胞质组分有关。这说明,海鞘胚胎细胞发育命运是由其所含有的细胞质决定子决定的,与细胞核无关。

海鞘属于典型的镶嵌型发育胚胎。除海鞘之外,呈典型的镶嵌型发育的胚胎还有栉水母(ctenophores)、环节动物(annelids)、线虫(nematodes)和软体动物(molluscs)等。在这些典型的镶嵌型发育的动物卵子细胞质中,都存在着形态发生决定子。另一方面,海胆、两栖类和鱼类等动物的

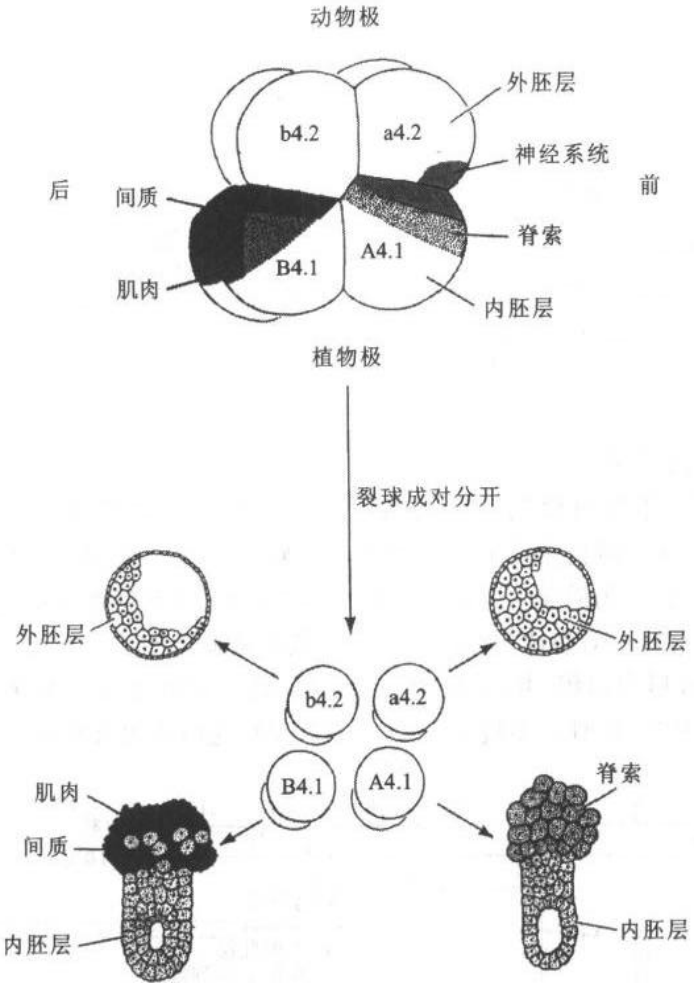


图 6.2　海鞘胚胎的镶嵌型决定作用

8－细胞期 4 对裂球分开后，每对裂球都形成独特的结构

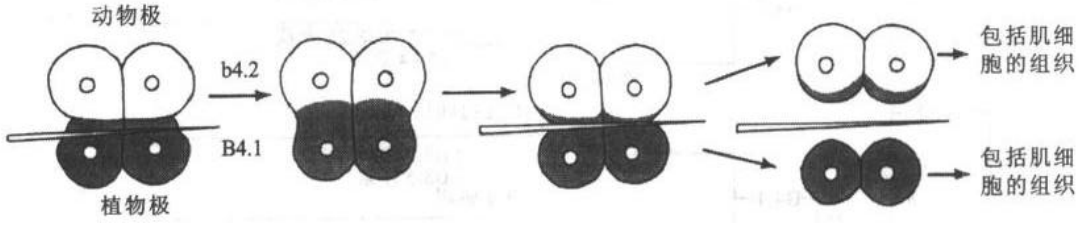


图 6.3　用玻针挤压 B4.1 裂球使原有分裂沟退化，而在更靠植物极处形成新分裂沟；新分裂沟将部分黄色新月物质分割到动物极 b4.2 裂球中

胚胎属于典型的调整型发育胚胎。在这些呈典型的调整型发育的动物卵子细胞质中，也都存在着形态发生决定子。大量研究表明，形态发生决定子广泛存在于各种动物的卵子细胞质中。

第三节 胞质定域

形态发生决定子在卵细胞质中呈一定形式分布,受精时发生运动,被分隔到一定区域,并在卵裂时分配到特定的裂球中,决定裂球的发育命运。这一现象称为胞质定域(cytoplasmic localization)。胞质定域也称为胞质隔离(cytoplasmic segregation)或胞质区域化(cytoplasmic regionalization)或胞质重排(cytoplasmic rearrangement)。

一、海鞘

1. 肌质和肌细胞的特化

Whittaker 于 1973 年用组织化学方法检测海鞘胚胎中乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)的发育情况,首先从组化角度证明海鞘胚胎的胞质定域。AChE 只存在于海鞘幼虫肌肉组织中,使幼虫肌肉能对神经刺激发生反应。根据 Conklin 等对海鞘胚胎细胞谱系(图 6.4)的研究,8-细胞期只有植物极后面一对裂球 B4.1 含有肌质,能形成肌肉组织。将 B4.1 两裂球分离下来单独培养时,同样可形成肌肉组织,并且 AChE 染色呈阳性。而其余 6 个裂球发育的胚胎无肌肉组织,体内也检测不到 AChE 活性。不过,Deno 等和 Nishida 先后证明海鞘动物极后面一对裂球 b4.2

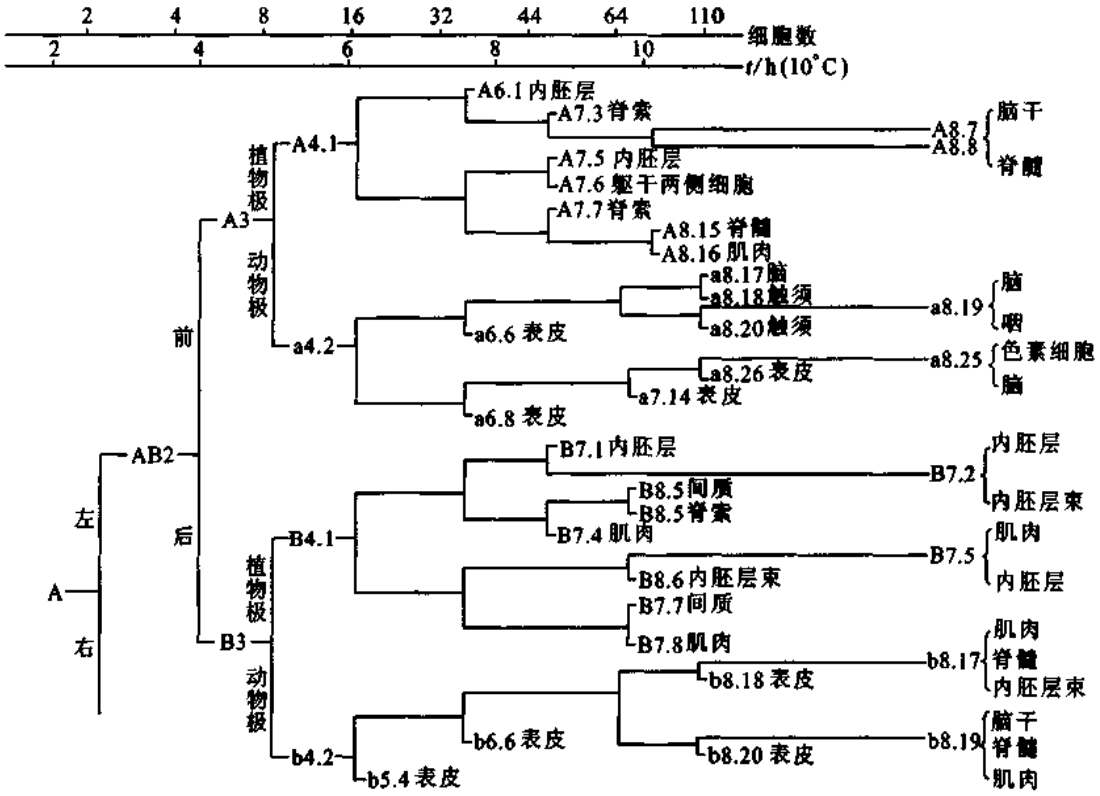


图 6.4 海鞘(*Halocynthia roretzi*)胚胎发育细胞谱系命运图
由于左右两半发育完全等同,故图中仅示半个胚胎细胞谱系

和植物极前面一对裂球 A4.1 在完整胚胎中也能形成肌肉，但这只能在完整胚胎中发生。当分离培养时，无论是 b4.2 还是 A4.1 都不能形成肌肉组织。据此，Meedel 等(1987)认为，非 B4.1 裂球来源的肌肉组织是由诱导形成的。这再次说明，即使在海鞘这样典型的镶嵌型发育的胚胎中，也存在着由细胞之间相互作用决定细胞发育命运的渐进决定作用。

细胞松弛素 B(cytochalasin B)能和微丝(microfilament)结合抑制细胞质分裂(cytokinesis)。当用细胞松弛素 B 处理海鞘不同时期胚胎时，细胞质分裂停止但细胞核分裂(karyokinesis)正常进行。对经细胞松弛素 B 处理的胚胎进行 AChE 活性测定后发现，2－细胞期 2 裂球都能产生 AChE；4－细胞期只有后面 2 裂球能产生 AChE；而 8－细胞期只有植物极后面 2 裂球能产生 AChE。另一方面，根据海鞘细胞谱系，2－细胞期时 2 裂球均含有肌质；4－细胞期时只有后面 2 裂球含有肌质；而 8－细胞期时只有植物极后面 2 裂球含有肌质。可见，在经细胞松弛素 B 处理的胚胎中，含有 AChE 的裂球和据细胞谱系推测出的含有肌质能产生肌肉组织的裂球完全吻合。此外，在经细胞松弛素 B 处理的胚胎中产生 AChE 的时间也和正常胚胎完全一致。因此，海鞘卵中的肌质在卵裂时分配到预定中胚层细胞中，并控制肌肉组织的发育分化。那么，肌质等形态发生决定子是如何发生作用的？前面讲述的细胞质移植实验证明，将海鞘胚胎裂球中肌质移植到预定非肌肉细胞中，可使本来不形成肌肉的裂球产生肌肉。而童第周等(1977)进行的细胞核移植实验则证明，无论供体核是取自海鞘原肠胚的外胚层、中胚层还是内胚层，只要受体卵块所含细胞质相同，那么所发育的胚胎结构就相同。因此，可以推测，肌质等形态发生决定子可能选择性地激活(或抑制)裂球中某些特定基因的表达，从而决定裂球的发育命运。已有实验证明，把海鞘受精卵中的黄色新月物质移植到预定形成表皮的 a4.2 裂球，能够诱导 a4.2 裂球中肌肉特异性蛋白——乙酰胆碱酯酶的基因表达。

2. 内胚层、表皮和前后轴的决定

海鞘内胚层和表皮细胞的特化已有一些实验分析。Reverberi 和 Minganti 最早通过裂球分离培养证实了 Conklin 所绘制的海鞘胚胎发育命运图谱。后来，Whittaker 也证明了碱性磷酸酶(alkaline phosphotase)是内胚层特异性酶，只有在预定形成消化道的细胞中才能产生碱性磷酸酶。Nishida(1993)通过细胞和细胞或者细胞和细胞碎块融合实验，借以追踪决定内胚层和表皮细胞发育命运的形态发生决定子。当一个细胞谱系的细胞或细胞碎块和另一个细胞谱系的细胞融合之后，用生化标记或抗体标记检测很容易发现融合细胞是否获得新的发育命运。结果表明，表皮决定子在受精过程中迁移到卵子动物极顶部(apical region)，卵裂时进入动物极裂球中，即 8－细胞期的 a4.2 和 b4.2 两对裂球中；而内胚层决定子在受精过程中迁移到卵子植物极半球，卵裂时进入植物极裂球中(图 6.5)。

伴随受精时卵子细胞质的运动，海鞘胚胎的前后轴也被决定下来。在受精时卵质运动完成后，如果去除卵子植物极后端大约 10% 的细胞质，则多数胚胎不能形成前后轴，而发育成具有前端的辐射对称性幼虫。海鞘受精卵植物极后端胞质(posterior vegetal cytoplasm，PVC)相对于其余部分细胞质呈“显性”。把一个受精卵的 PVC 移植到另一个已除去 PVC 的受精卵的前端，受体卵原来的前端便发育成新的后端，而原来的后端(已除去 PVC)则发育成前端。这些结果说明，海鞘胚胎后端的发育命运由卵细胞质中特定的胞质决定子决定，而前端的发育命运则由缺乏 PVC 所决定。这也和后端(如肌肉和内胚层)细胞的发育命运由胞质分离决定而前端(如脑和脊索)细胞的发育命运由诱导作用决定的观察结果一致。

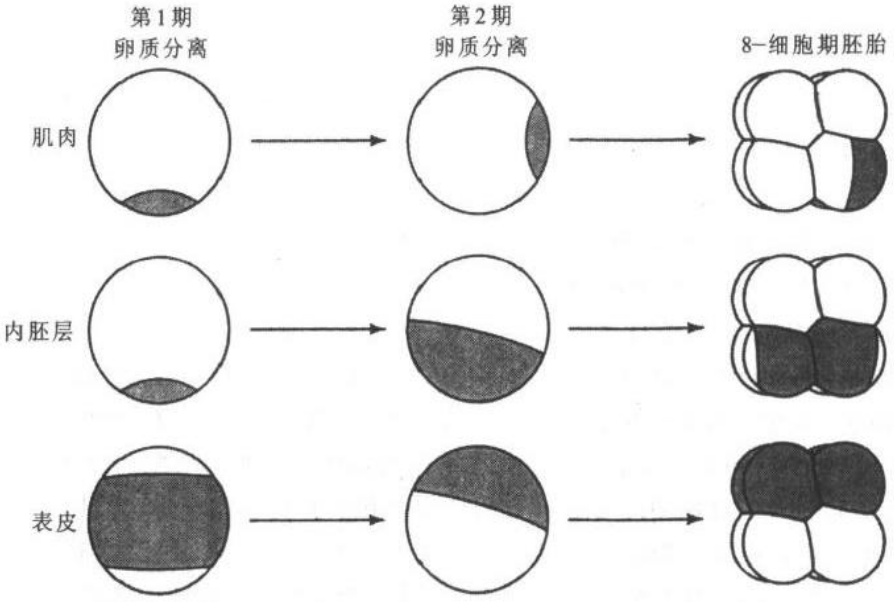


图 6.5 海鞘肌肉、内胚层和表皮三种组织胞质决定子的运动比较
图仅代表卵子表面观

总之，海鞘卵子受精时，卵质发生运动，产生独特的胞质区域；不同的胞质区域含有不同的形态发生决定子，并在卵裂时分配到不同裂球中。这些形态发生决定子的本质及其作用机理尚待进一步研究。

二、软体动物

Wilson 于 1904 年把帽贝（*Patella coerulea*）早期裂球分离，将其发育情况和完整胚胎内的相同裂球的发育情况进行比较，结果发现，分离裂球不仅发育命运而且分裂速度和分裂方式都和留在完整胚胎内的相同裂球一样（图 6.6）。据此，Wilson 认为，分离裂球本身不但含有决定分裂节奏和分裂方式所必需的全部物质，而且含有不依赖于胚胎其他细胞而进行自我分化所必需的全部物质。Wilson 还证明了分离裂球如同留在完整胚胎中一样进行分裂和分化是以其在卵裂时接受的特定的形态发生决定子为基础的。某些呈螺旋卵裂的胚胎（主要是软体动物和环节动物，在第一次卵裂前植物极部分向下凸起（如贻贝和角贝）或动物极向上举起（如强棘红螺）而在卵子植物极部分形成一个胞质凸起（图 6.7），通常称为极叶（polar lobe）。第一次卵裂时，受精卵不对称地分为两部分，形成两个裂球 AB 和 CD，极叶和 CD 裂球相连。在某些种类中，极叶和正在分裂的受精卵相连的部分很细，极叶体积约占卵子总体积的 1/3，因此，极叶看起来很像一个裂球。这时的胚胎外形呈三叶状，称为三叶期（trefoil stage）。第一次卵裂完成后，极叶缩回，并入 CD 裂球中，但在第二次卵裂开始前极叶再次凸出。第二次卵裂完成后，极叶只和 D 裂球相连，并缩回并入 D 裂球中。此后，极叶的出现就不明显了。极叶的形成是卵裂期间一种过渡性的形态变化，是由卵内部物质流动所引起的。Wilson 证明：① 在三叶期除去极叶，剩下的裂球虽然能正常分裂，但是，不能形成正常的担轮幼虫（trochophore larva），而是发育成缺乏中胚层器官——肌肉、口、壳腺和足——的幼虫；② 在 4－细胞期除去 D 裂球，剩下的 3 裂球和三叶期除去极叶的胚胎一样，也发育成缺乏中胚层结构的

幼虫。据此，Wilson 认为，极叶中含有控制 D 裂球特定分裂节奏、分裂方式以及中胚层分化所必需的决定子。

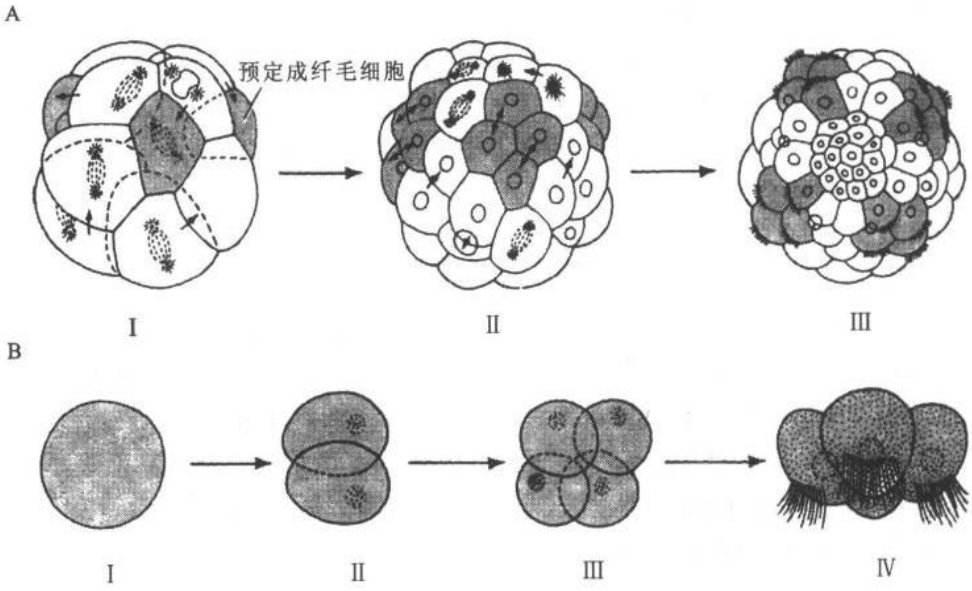


图 6.6　帽贝成纤毛细胞(trochoblast cell)的分化

A. 帽贝正常胚胎中成纤毛细胞的分化。Ⅰ. 16－细胞期侧面观。预定成纤毛细胞以深色表示。Ⅱ. 48－细胞期。Ⅲ. 纤毛幼虫期动物极观。纤毛位于成纤毛细胞上　B. 分离培养的帽贝成纤毛细胞的分化。Ⅰ. 分离的成纤毛细胞。Ⅱ，Ⅲ. 培养过程中第 1 和第 2 次卵裂。Ⅳ. 纤毛形成。即使分离后单独培养，成纤毛细胞同样在正常时间形成纤毛

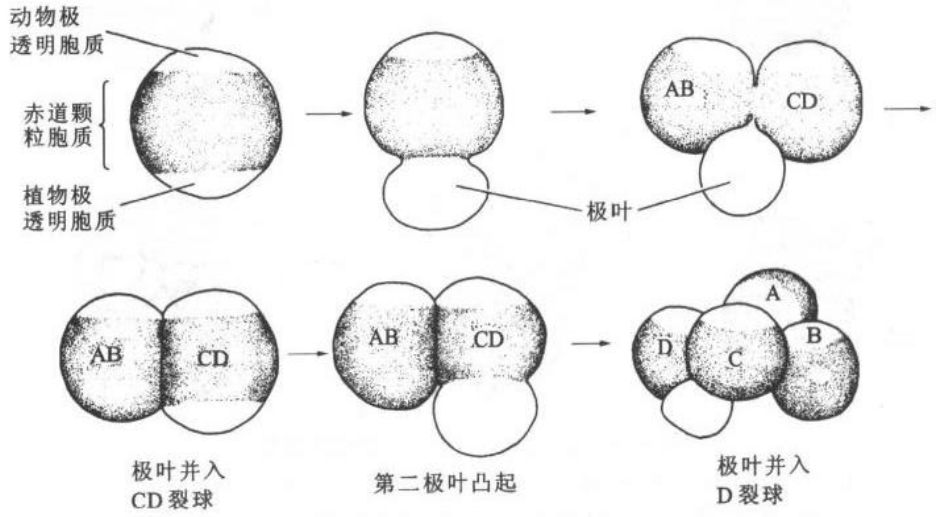


图 6.7　*Dentalium* 卵裂

极叶凸出和缩回各发生两次

壳腺是中胚层细胞诱导外胚层细胞形成的。中胚层不存在时，便没有诱导者诱导外胚层细胞

形成壳腺。这是镶嵌型发育胚胎中也存在细胞间相互作用决定细胞发育命运的又一例证。

需要指出的是,存在于极叶中的形态发生决定子可能位于卵子皮层或细胞骨架上,不会位于卵子可扩散的细胞质(diffusible cytoplasm)中。Clement(1968)把 *Ilyanassa obsoleta* 三叶期胚胎进行离心处理,使极叶中可扩散胞质流入 CD 裂球中,再切除极叶,结果发育的胚胎仍缺乏中胚层结构。用微吸管吸去极叶中的胞质后,卵子其他部分的细胞质便流进极叶填充留下的空间,结果胚胎可以正常发育;当把极叶胞质加入到 B 裂球时,B 裂球并不产生中胚层结构。因此,可扩散胞质中不含形态发生决定子。形态发生决定子很可能位于卵子皮层胞质中或细胞骨架上。

Clement(1986)对 D 裂球中形态发生决定子的进一步分配情况作了研究。由于极叶物质的并入,D 裂球比其他 3 裂球都大,故称为大裂球(macromere)。D 裂球分裂产生 1d 和 1D;1D 分裂产生 2d 和 2D;2D 分裂产生 3d 和 3D;3D 再分裂产生 4d 和 4D(图 6.8)。当除去 D 或 1D 或 2D 裂球时,发育的胚胎缺少心脏、消化道、面盘(velum)、壳腺、眼和足;当除去 3D 裂球时,发育的胚胎只缺少心脏或消化道,而眼、足、面盘和壳腺发育正常。可见,原先存在于 D 裂球中的某些形态发生决定子分配到了 3d 裂球中。当除去 D 裂球第四次分裂形成的 4D 裂球时,对胚胎发育已无质的影响。但是,除去 4d 裂球后,发育的胚胎既无心脏又无消化道。因此,形成心脏和消化道的决定子分配到了 4d 裂球中。4d 在下一次分裂时产生两个成中内胚层细胞(mesentoblast)。成中内胚层细胞将来发育形成中胚层(心脏)和内胚层(消化道)器官。

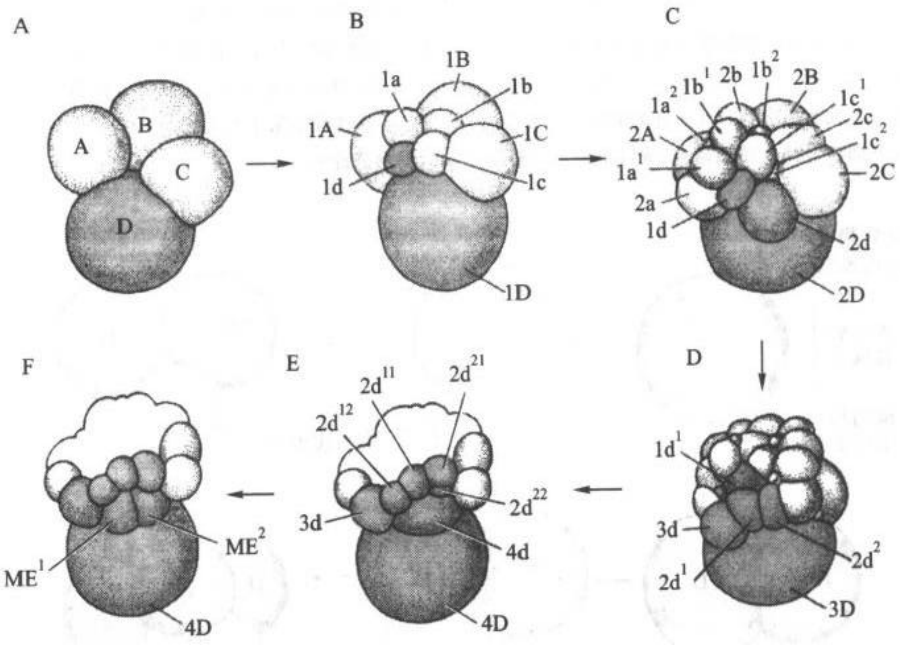


图 6.8 *Ilyanassa* 胚胎中 D 裂球的发育

A. 4-细胞胚胎 B. 8-细胞期的 1D 和 1d 裂球 C. 含有 2D 和 2d 裂球(由 1D 衍生来)的 16-细胞胚胎 D. 2D 大裂球分裂产生 3D 和 3d 裂球 E. 64-细胞期。3D 裂球分裂产生 4D 和 4d 裂球 F. 4d 裂球对称分为两个成中内胚层细胞 ME^1 和 ME^2

极叶还含有决定胚胎背腹轴形成的物质。用细胞松弛素处理角贝(*Dentalium vulgare*)正在分裂的受精卵,抑制极叶的形成。洗去细胞松弛素后,处理过的受精卵分裂成两个大小一样的裂

球。两裂球在下一次分裂前都形成极叶。可见,在第一次卵裂时极叶物质同时流入到两个裂球之中。由这种胚胎发育的幼虫是一对以腹部相连的孪生胚(图 6.9)。可见,如果第一次卵裂时极叶物质分配到两个裂球中,那么,每个裂球都能组织形成自己的背腹轴。因此,极叶含有决定背腹轴的决定子。

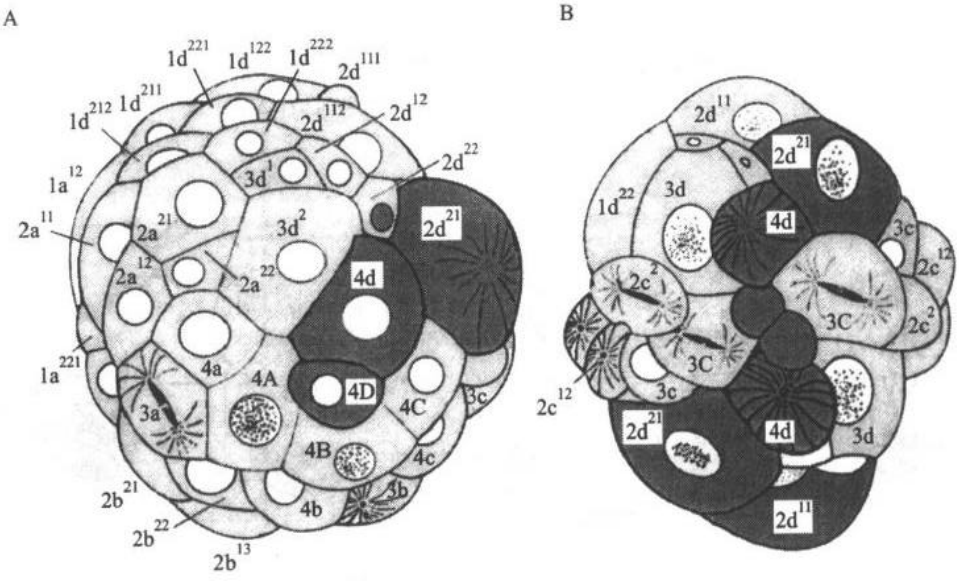


图 6.9 抑制 *Dentalium* 极叶形成将产生双生胚

A. 第 6 次卵裂期正常胚胎 B. 用低浓度细胞松弛素抑制极叶形成,极叶物质分配到 AB 和 CD 两裂球中,形成双生胚

虽然极叶对软体动物正常发育十分重要,但迄今为止,仍不清楚其作用机制。将有极叶和去极叶胚胎所合成的蛋白质和 mRNA 相互比较,并未发现两者之间存在显著差异。Atkinson(1987)观察了去除极叶胚胎中分化的面盘、消化系统和壳腺细胞,发现去极叶胚胎能产生这些细胞,但这些细胞并不构成有功能的组织和器官。其中,肌肉细胞散布于去极叶幼虫体内,并不聚集构成肌肉组织;而内胚层细胞虽然形成消化道组织,但彼此互不连接。这说明极叶在发育中所起的作用可能非常复杂。

三、线虫

1. 生殖细胞的特化

在卵细胞质中存在着呈区域性分布的形态发生决定子,这在整个动物界是一个普遍现象。最常见的形态发生决定子可能要算是生殖细胞决定子。即使在蛙类等的调整型卵子中,也存在着生殖细胞决定子。生殖细胞决定子在卵裂时分配到一定的裂球中,并决定这些裂球发育成生殖细胞。

Boveri(1862—1915)是第一个对胚胎发育中染色体的变化进行观察的人。副蛔虫(*Parascaris aequorum*,以前称马蛔虫 *Ascaris megalocephala*)单倍体生殖细胞只有两条染色体,比较容易对其单条染色体进行仔细观察。Boveri 于 1910 年发现,副蛔虫受精卵第一次分裂为纬裂,受精卵沿赤道分为动物极和植物极两个裂球。有趣的是,第一次卵裂形成的动物极裂球在下一次分裂开始前,

染色体两端裂解成数十个小片段，散落到细胞质中，不再加入到新形成的细胞核内，因而失去很多基因。这一现象称为染色体消减(chromosome diminution)。而植物极裂球仍保持正常数目的染色体。副蛔虫胚胎第二次分裂时，动物极裂球呈经裂，而植物极裂球仍呈纬裂。第二次卵裂形成的两个植物极裂球开始都含有正常数目的染色体。不过，其中靠近动物极裂球的染色体在下一次分裂前又发生消减。因此，在 4－细胞期，只有一个最靠近植物极的裂球含有全数染色体(全套基因)。在随后两次分裂中，最靠近植物极的裂球每分裂一次，就有一个裂球中的染色体发生消减。到 16－细胞期，只有两个裂球含全数染色体。在这两个裂球中，最终只有一个保留全数染色体，发育成生殖细胞，而另一个的染色体最终发生消减，形成体细胞(图 6.10A)。因此，全数染色体只存在于将来形成生殖细胞的裂球里。

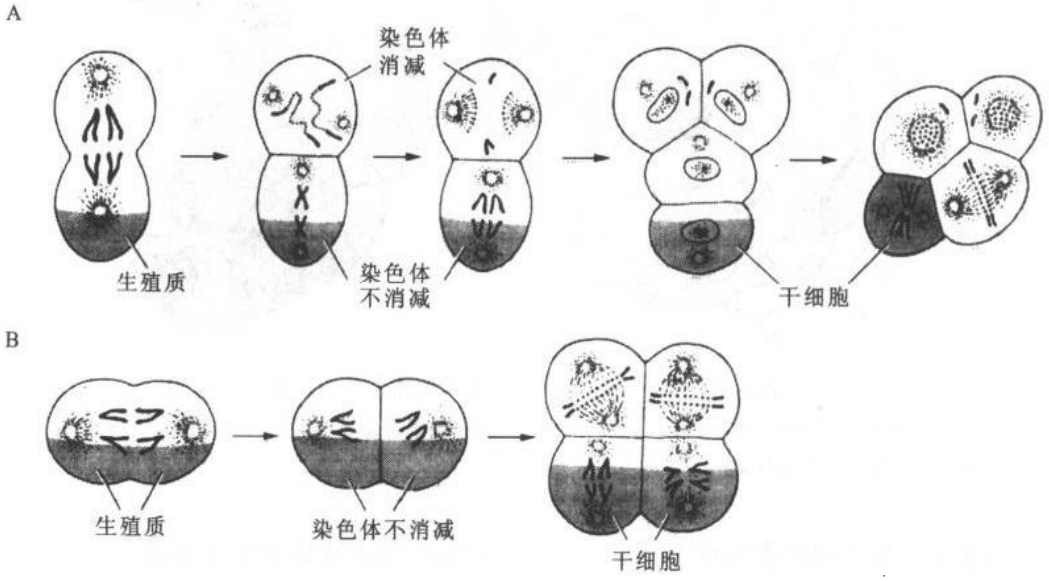


图 6.10 副蛔虫正常受精卵(A)和经离心处理的受精卵(B)分裂时生殖质的分布

A. 正常情况下生殖质保留在最靠植物极的一个裂球中，该裂球保留全数染色体，成为生殖干细胞

B. 离心使第一次卵裂面旋转 90°，由此形成的两裂球全保留有生殖质。两个裂球中的染色体都不发生消减。经过两次卵裂后，植物极两个裂球成为生殖干细胞

Boveri 被誉为最伟大的胚胎学观察家和实验家之一。他不满足于只有生殖细胞才保留全数染色体的观察结果，进而开始设想是不是卵内某些区域的细胞质能保护核内染色体免于消减。如果设想正确，那么，分配到该区域细胞质中的任一细胞核染色体都将得到保护而不会消减。事实正是如此。Boveri 将副蛔虫受精卵在分裂前经离心处理，使有丝分裂纺锤体方向发生旋转。当有丝分裂纺锤体旋转 90°和正常情况下有丝分裂纺锤体方向垂直时，卵裂由原来的纬裂变为经裂，形成的两个裂球细胞核染色体无一发生消减。不过，下一次分裂是沿赤道进行纬裂，形成的两个动物极裂球染色体都发生消减，而两个植物极裂球染色体都不发生消减(图 6.10B)。据此，Boveri 认为副蛔虫卵子植物极胞质中含有某些物质能保护细胞核染色体不发生消减，并决定有关裂球形成生殖细胞。副蛔虫卵子植物极胞质中所含的能决定生殖细胞形成的物质叫生殖质(germ plasm)。

2. 咽部原始细胞命运的决定

秀丽新小杆线虫胚胎细胞命运主要由卵内细胞质决定，而不是由邻近细胞间相互作用决定。据推测，蛋白质因子可以进入特定裂球的细胞核，激活或抑制特定基因表达，从而决定细胞命运。那么，在自主决定细胞谱系中是否发现有转录因子存在？秀丽新小杆线虫胚胎中发现的 SKN－1 蛋白质就很可能是一种"转录因子"样形态发生决定子。

SKN－1 是一种母源性多肽，它具有类似于 bZIP 簇转录因子和 DNA 结合的特征序列，并控制形成后部咽的 EMS 裂球的命运。第一次卵裂后产生 P1 和 AB 两裂球，只有后端 P1 裂球分离后可以自主产生咽细胞。P1 裂球分裂后，产生 EMS 和 P2 两裂球，只有 EMS 裂球分离后能产生咽部肌肉。而 EMS 裂球分裂后，产生 MS 和 E 两裂球，只有 MS 裂球具有形成咽组织的潜能。这表明，咽部细胞命运可以通过分离到这些裂球中的母源性因子(maternal factor)自主决定。Bowerman 等(1992)筛择出缺乏咽细胞的母体效应突变体，并分离出突变基因 *skn－1*。在 *skn－1* 缺陷型突变体中，只有预定形成咽和肠的细胞因突变受到影响。来自纯核 *skn－1* 缺陷型母体的胚胎既不能由 EMS 裂球产生咽，又不能由 EMS 裂球产生肠。它们在咽和肠的位置上形成额外真皮组织(extra hypodermal tissue)，取代正常咽和肠结构。

SKN－1 存在于卵细胞质中，处于无活性状态。第一次卵裂后，SKN－1 大部分进入 P1 裂球的细胞核中，少量进入 AB 裂球的细胞核中。第二次卵裂后，P1 产生的 EMS 和 P2 两个裂球的细胞核中都有 SKN－1。因此，SKN－1 可能是一种形态发生决定子，它能激活 P1 裂球及其产生的 EMS 和 P2 两裂球中的某些特定基因，从而决定它们的发育命运。不过，还需要 SKN－1 以外的一些因子，把 SKN－1 的功能限制在 EMS 裂球中，同时阻止它在 P2 裂球中发生作用。

把 SKN－1 功能限制在 4－细胞期的 EMS 裂球中是通过基因 *pie－1*(pharyngeal and imtestinal excess)和基因 *mex－1*(muscle excess)的活动来实现的。*pie－1* 和 *mex－1* 两者都可以调节 *skn－1* 的活动。*pie－1* 和 *mex－1* 基因突变将改变秀丽新小杆线虫 8－细胞胚胎中的细胞决定作用，产生一些额外的裂球预定形成 MS 细胞。在来自 *pie－1* 缺陷型母体的胚胎中，P3 和 C 两个姐妹裂球分别转变成 E 和 MS 裂球；而在来自 *mex－1* 缺陷型母体的胚胎中，AB 裂球所产生的子细胞都变成 MS 裂球。在来自同时缺乏 *pie－1* 产物和 *mex－1* 产物母体的胚胎中，其前端 6 个细胞为 MS 裂球，后端 2 个细胞为 E 裂球。由此可见，蛋白质 PIE－1 和蛋白质 MEX－1 可以各自单独发生作用：MEX－1 在第一次卵裂时使 SKN－1 不对称地分配到 P1 裂球中，而 PIE－1 在第二次卵裂时使 SKN－1 不对称地分配到 EMS 裂球中(图 6.11)。无论就哪一种情况而言，野生型基因 *skn－1* 都是额外的 MS 裂球形成所必需的；缺乏 *skn－1* 的胚胎不能产生咽。这就把蛋白 MEX－1、PIE－1 和蛋白 SKN－1 的激活而不是其位置联系起来了。因此，存在于细胞质中的蛋白 SKN－1 可能是一种转录因子，它能激活 MS 裂球中某些特定基因的表达，从而决定裂球的发育命运。阻止 SKN－1 使 P2 裂球决定形成咽的 PEI－1 也可能是一种转录因子，它拮抗 SKN－1 的作用。

PIE－1 也能起促进作用。每次卵裂过程中，PIE－1 保留在预定成为生殖细胞的裂球的中心体(centrosome)内。*pie－1* 基因母体突变导致预定成为生殖细胞的裂球发育成体细胞，P2 裂球和野生型 EMS 裂球作用一样。PIE－1 的定位及其遗传特性表明它能遏制体细胞命运决定，而保持生殖细胞的全能性。

第三次卵裂时，EMS 裂球产生 E 裂球(形成肠)和 MS 裂球(主要形成咽及肌壁细胞)。EMS 裂球含有 SKN－1，其分裂产生的每个子细胞都含有等量的 SKN－1。不难想象，虽然 SKN－1 在

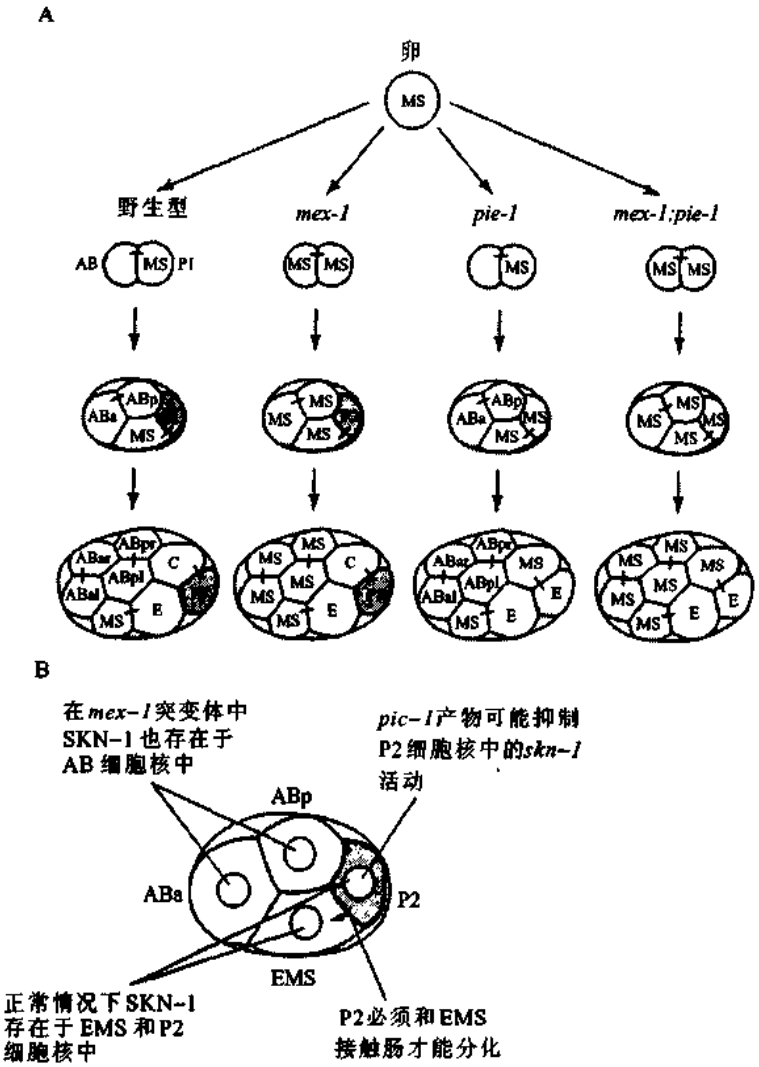


图 6.11 野生型和突变型胚胎中 MS 细胞决定模型

A. MS 决定子(据认为是 *skn－1* 基因产物)以无活性状态存在于卵子中。野生型胚胎第一次卵裂时，MS 决定子分隔到后端裂球(P1)中。而在第二次卵裂时，它进一步分配到 EMS 细胞中。第三次卵裂时，EMS 细胞分裂成 MS 细胞和 E 细胞。在 MS 细胞中，MS 决定子被激活。在来自 *mex－1* 缺陷型母体的胚胎中，MS 决定子在第一次卵裂时不发生分离，但在第二次卵裂时不能正常地不对称分配到 EMS 细胞中。在来自 *mex－1* 和 *pie－1* 双突变母体的胚胎中作用叠加起来，使 4－细胞期全部 4 个裂球无一含有具活性的 MS 决定子 B. *Skn－1*、*pie－1* 和 *mex－1* 之间的相互作用

决定哪个裂球形成咽部中胚层即哪个裂球成为 EMS 细胞时起关键作用，但是还需要 SKN－1 以外的一些因子把 MS 裂球和 E 裂球的发育命运分开。Lin 等(1995)认为，蛋白 POP－1 对 MS 裂球特化至关重要；缺乏 POP－1 时，MS 裂球发育命运和野生型 E 裂球一样。在这种蛋白的母体效应突变体中，MS 裂球既不发育成咽细胞，也不发育成肌肉细胞，而只发育成肠细胞。蛋白 POP－1 也可能是一种转录因子，可以和 SKN－1 相互作用，决定 MS 发育命运。

四、昆虫

1. 极质和生殖细胞的特化

某些昆虫卵中含有的生殖质像副蛔虫卵植物极的生殖质一样，能保护生殖细胞染色体免于消减。如蠓(*Wachtiellta persicariae*)胚胎卵裂时，多数细胞的细胞核从原来的 40 条染色体中竟失去 32 条，只有位于卵子后端(posterior pole)的 2 个细胞核染色体不会消减，而且可以停留一段时间不分裂(图 6.12)。最终，这 2 个细胞核形成生殖细胞的核。当用结扎方法阻止细胞核迁移入卵子后端细胞质时，所有胚胎细胞核染色体都会发生消减，由此发育成的蠓缺乏生殖细胞，不能繁殖；当结扎胚胎松开，让染色体消减后的细胞核进入卵子后端细胞质时，发育的蠓具有生殖细胞，但生殖细胞不能分化成有功能的精子和卵子。Kunz 等(1970)证明，消减的染色质中含有在生殖细胞形成过程中处于活跃状态的基因。

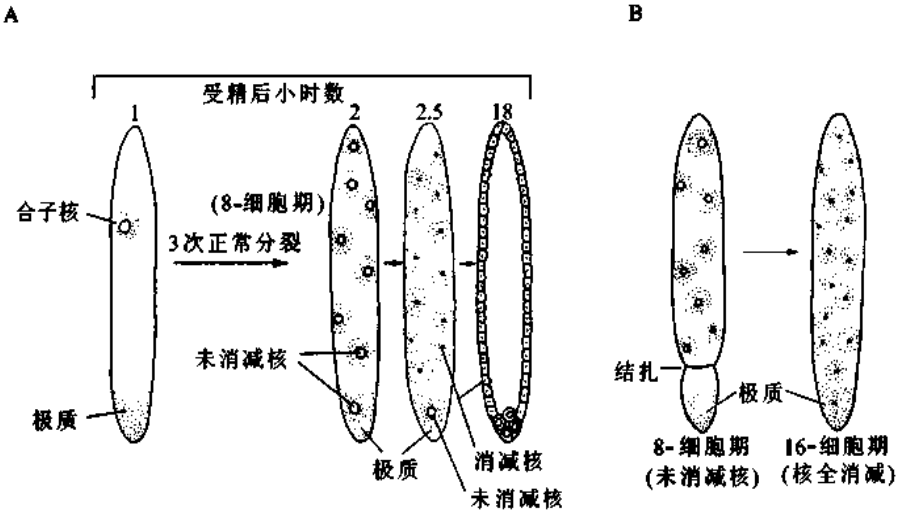


图 6.12 蠓胚胎中的染色体消减

A. 染色体消减取决于细胞核位置。前三次卵裂正常。此后，除后端 1 个细胞核之外，所有细胞核都失去 40 条染色体中的 32 条 B. 在 8－细胞期沿受精卵后端结扎，使细胞核无法迁移到后端细胞质中。这样，第四次卵裂后，所有 16 个细胞核都发生染色体消减

Hegner 于 1911 年发现，在极细胞(pole cell)形成前除去或破坏蜜蜂卵子的极质(pole plasm)即卵子后端的生殖质，发育的蜜蜂缺乏生殖细胞，不能繁殖。观察发现，在蜜蜂卵子极质中含有极粒(polar granule)。虽然极粒在生殖细胞决定中的作用尚不清楚，但是，极粒总是和极质以及后来形成的极细胞联系在一起，以至于成为辨认极质或极细胞时常用的标志。极细胞在扫描电镜下很容易辨认。

极粒在胚胎发育过程中不断变化。受精前，致密的膜状极粒聚集于线粒体周围。当胚胎细胞核迁移到极区前时，极粒分散开来，最终并入极细胞中。当极细胞向生殖嵴(germinal ridge)内迁移时，极粒进一步松散成被称为朦胧子(nuage)的细丝聚集于核膜周围。极粒这种变化很可能在整个动物都存在，并在配子发生中起重要作用。

2. 果蝇晚期发育中细胞不对称分裂

有关果蝇神经系统发育的研究表明,形态发生决定子可以在胚胎发育晚期当胚胎主要形体结构建立之后发生分离。在果蝇幼虫中枢神经系统形成时,神经干细胞(成神经细胞)分裂产生两个性质截然不同的子细胞:一个子细胞成为成神经细胞(干细胞,它继续维持细胞数目增加),另一个子细胞成为神经节母细胞(ganglion mother cell)。神经节母细胞分裂产生的细胞即预定分化成神经元。研究发现,神经节母细胞内含有一些特异性蛋白质,如膜蛋白 Numb 和转录因子 Prospero,正是 Numb 和 Prospero 这些特异性蛋白决定了神经元的发育命运。有趣的是,虽然 Numb 和 Prospero 特异性地分布于神经节母细胞内,但它们并不是在神经节母细胞内合成的,而是在成神经细胞中合成的。如何解释这一看似矛盾的现象呢?研究人员发现,Numb 和 Prospero 蛋白合成后位于成神经细胞的细胞质中,当成神经细胞开始分裂时,Numb 和 Prospero 蛋白便和将要成为神经节母细胞膜的那部分质膜相联系;至细胞分裂完成时,所有 Numb 和 Prospero 蛋白都分隔到神经节母细胞中(图 6.13)。Numb 和 Prospero 蛋白两者具有一段共同的氨基酸序列,据认为这一段共同的氨基酸序列可能与它们在成神经细胞分裂时的不对称分离有关。当这段共同的氨基酸序列被剔除后,Numb 和 Prospero 便会随机分配到两个子细胞中。

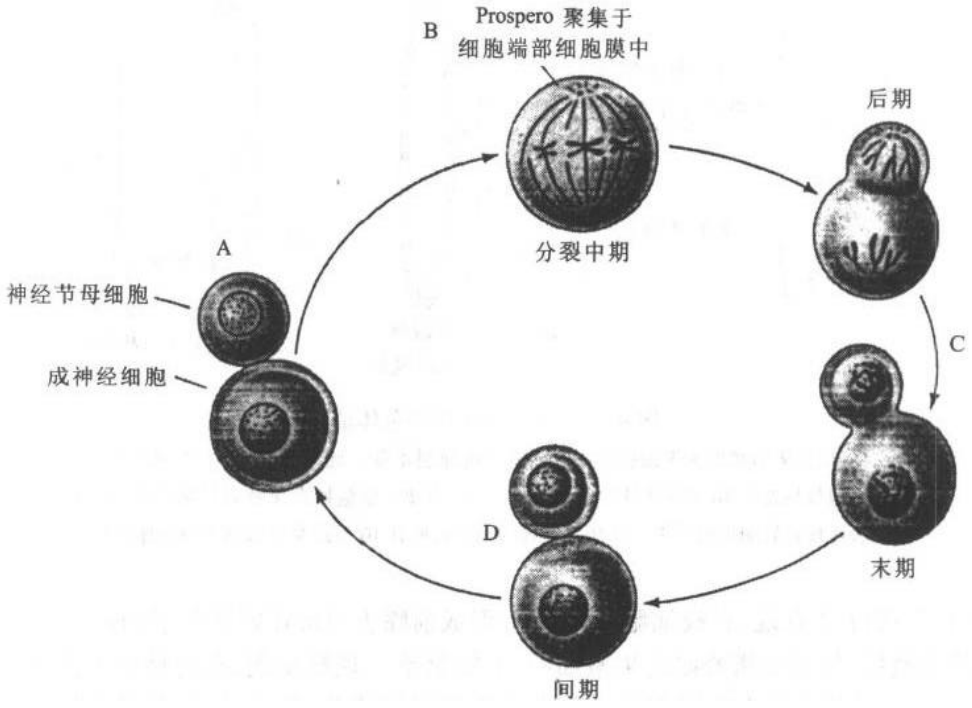


图 6.13 神经节母细胞发育过程中 Prospero 蛋白的不对称分布

A. 成神经细胞合成 Prospero 蛋白,扩散分布于细胞质中 B. 有丝分裂中期,所有 Prospero 蛋白聚集于正在分裂的成神经细胞一端 C. 有丝分裂后期和末期,Prospero 蛋白进入神经节母细胞,而成神经细胞中不存在 Prospero 蛋白 D. 作为转录因子的 Prospero 蛋白进入神经节母细胞细胞核中。Numb 蛋白离开成神经细胞后和 Prospero 蛋白一起进入神经节母细胞细胞核中。同样,Numb 蛋白在成神经细胞核中也不存在

五、两栖类生殖细胞的特化

Bounoure 于 1934 年发现林蛙(*Rana temporaria*)受精卵的植物极皮层区域含有染色特性和果蝇卵中极质类似的物质,在发育过程中流入少数几个预定内胚层细胞,最终迁移到生殖嵴内。Blackler(1962)证明,预定要迁移到生殖嵴含有蛙卵植物极皮层物质的内胚层细胞是原始生殖细胞前体。他把蛙神经胚中预定要迁移到生殖嵴内且含有蛙卵植物极皮层物质的细胞的内胚层区切割下来,移植到另一只蛙的神经胚中。供体蛙细胞核只有一个核仁,而受体蛙细胞核有两个核仁,因此两者彼此容易分辨。实验结果表明:① 去除生殖细胞内胚层区域的供体胚胎发育成的蛙不育;② 受体胚胎发育成的蛙不但可以正常繁殖,而且和正常蛙交配产生的后代既有细胞核含两个核仁的蛙,也有细胞核含一个核仁的蛙。这说明:① 蛙类神经胚已经失去调整产生生殖细胞的能力;② 含有蛙卵植物极皮层物质的内胚层细胞确实是原始生殖细胞的前体。

用 UV 照射蛙受精卵植物极后,发育的蛙外观各方面都正常,但是不育。如用 UV 照射卵子不同部位,发现照射卵子动物极不影响胚胎正常发育,但是照射卵子植物极产生的蝌蚪缺乏生殖细胞。如把正常卵子植物极细胞质移植到经 UV 照射过的卵子植物极,结果受体胚胎发育成的蝌蚪体内具有原始生殖细胞。相比之下,将正常卵子动物极细胞质移植到经 UV 照射过的卵子植物极,发育成的蝌蚪仍缺乏生殖细胞。Züst 等(1977)证明:在 2 - 至 4 - 细胞期用 UV 照射胚胎裂球植物极,由此形成的蝌蚪的生殖嵴中含有原始生殖细胞;不过,原始生殖细胞数量明显减少,而且细胞体积很小,只有正常原始生殖细胞的 1/10 大,细胞核也畸形。这些原始生殖细胞迁移到生殖嵴的时间比正常情况下晚得多。由此可见,蛙类受精卵植物极区域细胞质中含有控制生殖细胞形成和迁移的决定子。

第四节　形态发生决定子的性质

形态发生决定子不但广泛存在于动物卵细胞质中,而且在细胞自主特化中可以起决定性作用。现在的问题是:形态发生决定子的化学本质是什么?它们又是如何发生作用的?学术界一般认为,形态发生决定子可能是某些特异性蛋白质或 mRNA 等生物大分子物质,它们可以激活或抑制某些基因表达,从而决定细胞分化方向。关于形态发生决定子的性质和作用方式,在海鞘和果蝇中研究较为深入。

一、海鞘形态发生决定子

用抑制剂处理胚胎阻遏胚胎细胞转录和翻译的实验表明,海鞘胚胎中可能含有两类形态发生决定子。第一类是可以激活某些基因(如乙酰胆碱酯酶基因)转录的物质;第二类可能是 mRNA。当玻璃海鞘(*Ciona*)胚胎放在转录抑制剂放线菌素 D(actinomycin D)溶液中培养时,不能形成 AChE,这说明乙酰胆碱酯酶基因没被激活。将从海鞘各期胚胎中纯化的 mRNA 注入蛙卵时,可以翻译成蛋白质。Meedel 和 Whittaker 用这一方法证明:海鞘直到原肠胚期才能在 B4.1 裂球后裔细胞中检测到乙酰胆碱酯酶 mRNA。可见 AChE 是由新合成的 mRNA 翻译来的。另一方面,Crowther 和 Whittaker 发现海鞘胚胎中多数组织特异性结构的形成都对转录抑制剂敏感,由此推

测形态发生决定子可能通过激活某些特定基因转录而发生作用。

海鞘胚胎中第二类形态发生决定子可能是以 mRNA 的形式存在于卵内一定区域。碱性磷酸酶是海鞘胚胎内胚层特异性酶。用抑制 mRNA 合成的放线菌素 D 处理海鞘胚胎,不影响碱性磷酸酶的形成,但是用抑制蛋白质合成的嘌呤霉素(puromycin)处理海鞘胚胎,则抑制碱性磷酸酶的产生。因此,海鞘内胚层的碱性磷酸酶 mRNA 必定已存在于卵细胞质中,它在卵裂时分离到将来发育成内胚层的裂球中。

Jeffery 等(1986)证明控制柄海鞘肌肉特异性肌动蛋白形成的决定子也是以 mRNA 的形式存在于卵细胞质中。但是,他们发现海鞘去核受精卵不能产生碱性磷酸酶。如果碱性磷酸酶的合成是由翻译而来,而与细胞核完全无关,那么,在无核受精卵中碱性磷酸酶应该表达,可事实与此相悖。将 Jeffery 等的实验和 Whittaker 的实验比较,我们获得一点重要启示:不同的实验可能获得不同的结果,进而得出不同的结论。Whittaker 测量的是经抑制剂处理过的胚胎内的碱性磷酸酶活性。实验假定抑制剂以同样方式进入每个细胞,并且同样地影响每一个基因的表达;除去基因转录或表达被特异性地阻断之外,抑制剂不影响其他发育过程。Jeffery 等测量的是无核受精卵中碱性磷酸酶的活性。实验假定碱性磷酸酶 mRNA(如果确实存在的话)不和卵原核结合在一起,完全游离于细胞质中,而且,碱性磷酸酶 mRNA 的翻译和其他转录调控的因素没有关系。其实,无论是 Whitteker 还是 Jefferry 等都没能直接测定细胞的决定状态,他们都是根据细胞分化的结果推测细胞早先的决定状态。要探讨胚胎细胞的决定状态,应对决定细胞发育命运的蛋白质或 mRNA 分析鉴别,而不是对细胞分化时所产生的特异性蛋白质或 mRNA 分析鉴别。

Swalla 和 Jeffery(1995)研究了 RNA 在海鞘卵内的空间分布,发现和卵母细胞细胞骨架结合在一起的母体 RNA 也可能是黄色新月区中决定肌肉细胞形成的形态发生决定子。这种母体 RNA 存在于卵子整个皮层中,受精后随黄色胞质一起分隔到植物极,接着分隔到植物极后端部分,成为黄色新月组分。在卵裂过程中,它总是出现在预定肌肉细胞中。这种母体 RNA 可能不编码某种蛋白质。目前,尚不知道把这种 RNA 移植到非肌肉细胞中能否诱导受体细胞分化成肌肉细胞。

二、果蝇极质

果蝇卵子极粒已被分离出来,它主要由蛋白质和 RNA 组成。对这些生物大分子功能的研究主要依赖于遗传学方法。生殖质(极质)的组分之一是 *gcl*(germ cell - less)基因转录的 mRNA。*gcl* 基因是由 Jongens 等于 1992 年发现的。他们先诱发果蝇突变,再从中筛选出子一代不育的"绝孙突变"雌性果蝇。其基本原理是:如果雌性个体在其卵子中不存在有功能的生殖质,它仍能产生子一代,但子一代因为缺乏生殖细胞,所以不育。野生型 *gcl* 基因在果蝇卵巢的营养细胞中转录,所转录的 mRNA 通过环管(ring canal)转运至卵子中。*gcl* mRNA 一旦进入卵子,便进一步迁移到卵子最后端,定位于称为极质的细胞质中。*gcl* mRNA 在卵裂早期翻译成蛋白质。由 *gcl* 基因编码的蛋白质在卵裂时进入细胞核内,成为极细胞形成所必不可少的成分。如果把与 *gcl* mRNA 相对的反义 RNA 注射到卵子中,受体胚胎就如同 *gcl* 基因突变体一样,缺乏产生生殖细胞的能力。

生殖细胞决定子的另一种可能是 Nanos 蛋白。*nanos* mRNA 位于卵子后端,其翻译的蛋白质为果蝇形成腹部所必需。Kobayashi 等(1996)证明 Nanos 蛋白也是生殖细胞形成所必需的成分。缺乏 Nanos 蛋白的极细胞不能迁移到生殖腺中,因而不能发育成生殖细胞。令人惊奇的是,生殖细胞决定子也可能是线粒体大核糖体 RNA(mitochondrial large ribosomal RNA, mtlrRNA)。用经过

UV 照射的卵子作分析系统，Kobayashi 和 Okada (1989)证明注射 mtlrRNA 可以恢复经 UV 照射的胚胎形成极细胞的能力。不仅如此，mtlrRNA 在正常果蝇卵子中完全位于线粒体之外，存在于卵裂期胚胎的极质中。由此可见，mtlrRNA 是一种极粒组分。虽然 mtlrRNA 参与决定胚胎极细胞的形成，但它并不进入极细胞内。

果蝇生殖细胞决定子还可能是位于极粒中不可翻译的 RNA(non－translatable RNA)。由于不可翻译 RNA 是存在于极粒中的成分，因此也称为极粒组分(polar granule component，Pgc)。虽然 Pgc 的确切功能尚不知道，但是 Pgc 显然对果蝇极细胞形成至关重要，因为与 Pgc 相对的反义 RNA 转基因雌性果蝇的极细胞不能迁移到生殖腺中。

那么，是什么驱使 *gcl* mRNA、*nanos* mRNA、mtlrRNA 以及其他一些存在于极质中的分子迁移到卵子后端的呢？除去绝孙突变外，至少还有 7 种突变体腹部发育不良，且都不能产生生殖细胞。这些突变体由下列 7 种基因突变而产生，即 *cappucino*、*spire*、*staufen*、*oskar*、*vasa*、*valoir* 和 *tudor* 基因。上述 7 种基因在卵巢内都非常活跃，每种基因都产生自己的基因产物分布于正在生长的卵母细胞中。通过探测突变体中基因产物 mRNA 或蛋白质的定位，可以搞清楚上述基因作用的层次顺序(图 6.14)。现在已经知道：*cappucino* 和 *spire* 基因编码的两种蛋白 Cappucino 和 Spire 是 Staufen 蛋白定位于卵子后端所必需的，如果雌性果蝇不能合成 Cappucino 和 Spire，Staufen 便不会迁移并定位在卵子后端；而 Staufen 又是 *oskar* mRNA 定位于卵子后端所必需的。由 *oskar* mRNA 翻译的蛋白 Oskar 是极粒的一种组分，它又是另一种极粒组分 Vasa 蛋白定位于卵子后端所必需的。虽然 *tudor* 和 *valoir* 突变体并不影响 Vasa 蛋白定位，但 Tudor 和 Valoir 蛋白都是维系 Vasa 位于极质中所不可或缺的。

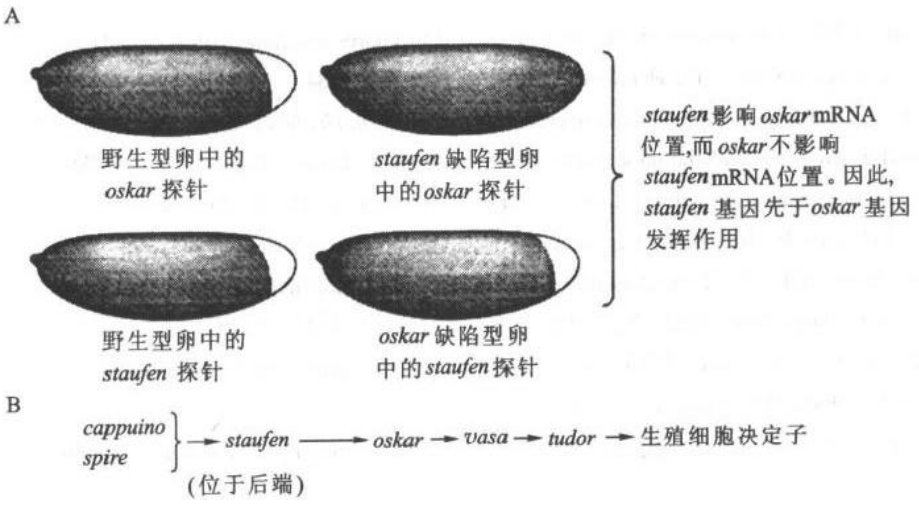


图 6.14

A. 确定生殖细胞决定子定位于卵子后端的遗传途径原理示意图　B. 遗传途径总结

极质的形成受 *oskar* mRNA 控制。*oskar* mRNA 含量及其定位不但决定极细胞数量的多少，而且决定极细胞形成的位置。来自单拷贝 *oskar* 基因雌性个体的胚胎在细胞性囊胚期可以产生约 10～15 个极细胞；而来自双拷贝 *oskar* 基因雌性个体的胚胎可以产生约 35 个极细胞。如果雌性个

体 *oskar* 基因拷贝增加到 4,则其胚胎可形成大约 50 个极细胞。可见 *oskar* mRNA 含量的多少决定极细胞数量的多少。另一方面,Ephrussi 和 Lehmann(1992)证明生殖细胞总是在 *oskar* mRNA 所处位置产生。如果人为干预使 *oskar* mRNA 定位于胚胎前端,生殖细胞就会在胚胎前端形成。Oskar 蛋白很可能构成极粒架构(scaffold)的第一部分。当 Vasa 和 Tudor 两种蛋白结合到 Oskar 上之后,便形成可以结合生殖细胞决定子的更为复杂的极粒架构。在 Vasa 和 Tudor 与 Oskar 结合这一步之前,*cappucino*→*spire*→*staufen*→*oskar* 链中任一基因突变都会破坏生殖细胞决定子,如 *gcl* mRNA 和 mtlrRNA 等定位于卵子后端。在 *valoir* 和 *tudor* 基因突变体中,可以发现有少量 *gcl* mRNA 定位于卵裂早期胚胎后端细胞质中,但是这些少量 *gcl* mRNA 很快于卵裂晚期消失。因此,极粒既包括生殖细胞决定子又包括维系生殖细胞决定子于卵子和胚胎后端的架构。该架构能结合 *gcl* mRNA(可能还有其他与生殖细胞决定子有关的基因产物)。在卵裂晚期,*gcl* mRNA 翻译成蛋白质,进入极细胞核内,通过某种尚未知的方式决定极细胞发育成生殖细胞。

参考文献

1 Atkinson J W. An atlas of light micrographs of normal and lobeless larvae of the marine gastropod *Ilyanassa obsolete*. Int. J. Invert. Reprod. Dev., 1987,9: 169~178

2 Blackler A W. Transfer of primordial germ cells between two subspecies of *Xenopus laevis*. J. Embryol. Exp. Morphol., 1962,10: 641~651

3 Bowerman B, *et al*. *skn* - *1*, a maternally expressed gene required to specify the fate of ventral blastomeres in the early *C. elegans* embryo. Cell, 1992,68: 1061~1075

4 Boyd L, *et al*. PAR - 2 is asymmetrically distributed and promotes association of P granules and PAR - 1 with the cortex in *C. elegans* embryos. Development, 1996, 122: 3075~3084

5 Clement A C. The embryonic value of the micromeres in *Ilyanassa obsoleta*, as determined by deletion experiments. Ⅲ. The third quartet cells and the mesentoblast cell, 4d. Int. J. Invert. Reprod. Dev., 1986, 9: 155~168

6 Conklin E G. The organization and cell lineage of the ascidian egg. J. Acad. Nat. Sci. Phila., 1905, 13: 1~19

7 Ephrussi A, Lehmann R. Induction of germ cell formation by *oskar*. Nature, 1992,358: 387~392

8 Illmensee K, Mahowald A P. Transplantation of posterior polar plasm in *Drosophila*. Induction of germ cells at the anterior pole of the egg. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974, 71: 1016~1020

9 Jeffery W R, *et al*. Is maternal mRNA a determinant of tissue - specific proteins in ascidian embryos? J. Embryol. Exp. Morphol., 1986, 97 (Suppl.): 1~14

10 Knoblich J A, *et al*. Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division. Nature, 1995, 377: 624~627

11 Kobayashi S, Okada M. Restoration of pole - cell forming ability to UV - irradiated *Drosophila* embryos by injection of mitochondrial lr RNA. Development, 1989, 107: 733~742

12 Kobayashi S, *et al*. Essential role of the posterior morphogen nanos for germline development in *Drosophila*. Nature, 1996, 380: 708~711

13 Kunz W, *et al*. On the function of the germ line chromosomes in the oogenesis of *Wachtiella persiariae* (Cecidomyiidae). Chromosoma, 1970, 30: 180~192

14 Lin R, *et al*. *pop* - *1* encodes an HMG box protein required for the specificaton of a mesoderm precursor in early *C*.

elegans embryos. Cell , 1995,83: 599～609

15 Meedel T H, *et al*. Determinative properties of muscle lineages in ascidian embryos. Development, 1987, 100: 245～260

16 Nishida H. Localized regions of egg cytoplasm that promote expression of endoderm－specific alkaline phosphatase in embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Development, 1993, 118: 1～7

17 Nishida H. Localization of determinants for formation of the anterior－posterior axis in eggs of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Development, 1994, 120: 3093～3140

18 Swalla B J, Jeffery W R. A maternal RNA localized in the yellow crescent is segregated to the larval muscle cells during ascidian development. Dev. Biol., 1995, 170: 353～364

19 Tung T C, *et al*. Cell differentiation in ascidians studied by nuclear transplantation. Scientia Sinica, 1977, 20: 222～233

20 Züst B, Dixon K E. Events in the germ cell lineage after entry of the primordial germ cells into the genital ridges in normal and UV－irradiated *Xenopus lacvis*. J. Embryol. Exp. Morphol. , 1977,41: 33～46

第七章　细胞命运的渐进特化：胚胎细胞相互作用

上一章主要讨论细胞命运通过胞质决定子的自主特化，即受精卵分裂时卵细胞质组分分隔到特定的裂球中，从而决定裂球的分化方向。与此相反，在海胆和脊椎动物等后口动物中，细胞命运取决于它在胚胎中所处的位置，而不是取决于它在卵裂时获得哪一块细胞质。一般认为：动物细胞主要以"自主方式"或"有条件或依赖型方式"两种方式特化。多数无脊椎动物胚胎细胞以自主方式特化，而多数脊椎动物胚胎细胞以依赖型方式特化。如前一章所述，"自主方式"是每个细胞命运由其"祖先"决定；这里，谱系非常重要。而"依赖型方式"存在大量细胞混合，每个细胞命运由其"邻居"决定；每个细胞开始都具有相似的潜能，其发育命运取决于它遇到哪些细胞。在以"依赖型方式"发育的胚胎中，至少在早期卵裂时，从胚胎上分离下来的每个细胞都能发育成一个完整的胚胎，而其余的细胞也能改变命运，形成正常胚胎。细胞的依赖型特化产生调整型发育。

在自主型发育(autonomous development)即镶嵌型发育过程中，胚轴和细胞命运由细胞质在每一裂球中的分配决定。但是，在调整型发育过程中，胚轴和细胞命运则由胚胎细胞相互作用决定。因此，胚胎一部分细胞对邻近另一部分细胞产生影响，并决定其分化方向的作用，即胚胎诱导(embryonic induction)，是决定胚胎细胞分化方向的一个极重要的方面。胚胎诱导决定细胞分化方向观念的形成是随有关发育镶嵌理论(mosaic theory)片面性的发现而逐渐发展起来的。

第一节　验证"种质学说"

一、种质学说

19世纪末德国学者所提出的镶嵌型发育理论的失败导致调整型发育理论的发现。早在1883年，August Weismann (1834—1914)就试图提出一种能解释诸如遗传、发育、再生、有性生殖和自然选择进化等各种不同生命现象的假说。19世纪70年代，细胞学研究工作取得很大发展。Oskar Hertwig于1876年观察到，受精时不但卵子和精子融合在一起，而且它们的细胞核也融合在一起。Van Beneden等于1883年证明：① 不同种生物的体细胞核内含有不同数目的染色体；② 同一种生物每个体细胞内所含染色体的数目是一定的；③ 每种生物染色体数目在生殖细胞进行减数分裂时减半，在受精时又恢复原有数目。在此基础上，Weismann大胆地提出了解释细胞分化的种质学说(germ plasm theory)，即有关细胞分化的机械模型(mechanical model)。

首先，Weismann假定卵子和精子对新生有机体贡献出质量和数量等同的染色体。其次，他假定染色体是由各种能决定细胞发育命运的核决定子(nuclear determinant)组成的，染色体携带全部的遗传物质，是有机体世代延续的基础。受精卵在分裂时，虽然每个裂球内都分配有相同数目的染

色体，但是，组成染色体的核决定子并非均等地分配到每个裂球中，也就是说每个裂球只接受了部分核决定子。不同的核决定子在胚胎发育过程中分配到不同的细胞内，由此决定细胞的发育命运，使其发育成身体的某一特定部分。例如，接受血液决定子（blood－forming determinant）的细胞发育成血细胞，接受肌肉决定子（muscle－forming determinant）的细胞发育成肌肉等等。只有那些最终将发育成生殖细胞的细胞才接受全部的核决定子，由此将亲代性状传递给子代，并保持物种的稳定性。由此可见，Weismann 的种质学说将组成有机体的细胞分为两类：体细胞（somatic cell）和生殖细胞（germ cell）。体细胞是从生殖细胞发育而来的，是各种各样的，随着个体的死亡而死亡。而生殖细胞完全不同于体细胞，是世代相传的，是永生的（immortality），不受体细胞和环境的影响。Weismann 甚至用实验来证明他的种质学说。他将新生小鼠尾巴连续切除十几代后，发现其子代仍长出正常尾巴，他认为这是对他假说的支持。

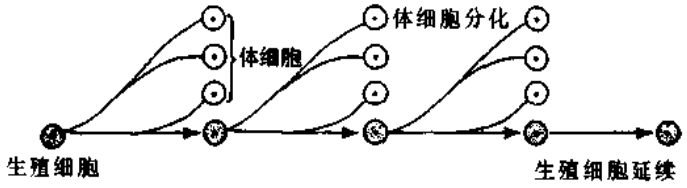


图 7.1　魏斯曼的种质学说
生殖细胞产生分化的体细胞（白色）和新的生殖细胞（暗色）

Weismann 的种质学说如图 7.1 所示。该学说强调生殖细胞的连续性和不死性，这与成年有机体生命的有限性形成鲜明对照。Weismann 种质学说对后世影响很大。这从著名胚胎学家 Wilson E B 声称其巨著 *The Cell in Development and Inheritance*（1896）就是由 Weismann 种质假说派生出来的产物，可见一斑。从 Wilson 书中的一段话也可看出 Weismann 种质假说的影响："个体之死亡，不包括通过细胞分裂使物种延续的连续性之中断。个体死了，这是事实，但生殖细胞还活着；物种正是通过生殖细胞得以一代代延续和发展。"

Weismann 的假说是不是正确的？可以用实验来验证这个问题。细胞的决定和分化如果是由于核决定子分配到不同的细胞而实现的，那么，就可以推论：① 不同的胚胎细胞的细胞核应该有本质上的差异；② 如果扰乱受精卵的卵裂过程，必然导致核决定子在细胞之间分布不正常，从而引起不正常发育。可是，实验胚胎学的结果并不支持 Weismann 的假说。

二、Wilhelm Roux：镶嵌型发育

Weismann 凭直觉认为：染色体是发育的遗传信息携带者。最为重要的是，他所提出的假说是一个可以立即用实验来验证的模型。Weismann 曾假定：第一次卵裂产生左右两裂球，对应未来胚胎的左边和右边，就是由于左右两裂球分别接受了左侧决定子（left determinant）和右侧决定子（right determinant）的结果。德国胚胎学家 Wilhelm Roux（1831—1904）检验了 Weismann 这一假设。他于 1888 年发表的一系列实验结果表明：在蛙胚 2－细胞期，用热针刺死一个裂球（未吸去坏死的细胞质），剩下的一个裂球发育成半个身体的胚胎（图 7.2）。Roux 的实验结果正好和 Weismann 假设预期的结果吻合。Roux 认为：蛙胚是由能自我分化的各部分组织在一起形成的镶嵌体，每一部分的发育命运是不能改变的，因为每个细胞接受一组特定的核决定子，并依据所接受的核决定子分化成相应的组织。Roux 把这一类型的发育称为镶嵌型发育。

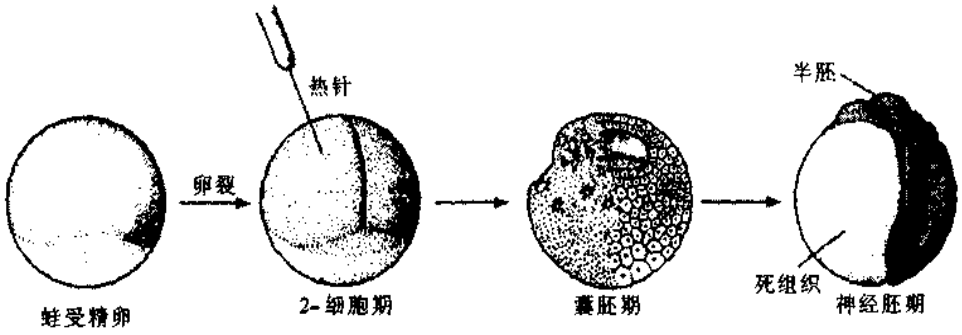


图 7.2 Roux 证明镶嵌型发育的尝试

用热针损伤蛙胚 2－细胞期一个裂球，导致"半胚"形成

完成上述一系列实验之后，Roux 开始了他的发生机械学(developmental mechanics)研究计划，即用实验和生理学方法研究胚胎学，并一改过去坚持胚胎学仅是研究进化的手段的观点，认为胚胎学是一门独立的实验科学。后来，McClendon 于 1910 年进行了与 Roux 实验类似的实验，把蛙胚两裂球分离开。结果发现：分开的两裂球都可以发育成完整的幼体。这表明蛙胚 2－细胞期的细胞核是等同的，并没有核决定子不均等分配的现象。由此可见 Roux 实验所得的结论是错误的，Weismann 的种质假说也是值得怀疑的。Roux 实验中蛙胚呈镶嵌型发育的结果纯粹是实验(缺损实验)的假象。坏死裂球的内部或者表面某些物质仍能和存活的裂球进行交流，从而影响后者的发育。

Roux 的实验虽然得出了错误的结论，但是他在蛙胚上的一系列实验开创了用实验方法研究胚胎学的先例，使他成为实验胚胎学的奠基人之一。再者，大量的研究结果表明：许多动物如软体动物、环节动物和海鞘等卵细胞质中确实存在着胞质决定子(cytoplasmic determinant)即形态发生决定子，影响以后的胚胎发育，因而，镶嵌型胚胎发育这一术语仍然沿用至今。

三、Hans Driesch：调整型发育

从实验方法上讲，Roux 的实验属于缺损实验(defect experiment)，要回答的问题是：当胚胎一部分裂球被破坏后，余下的裂球将如何发育？Hans Driesch 是用实验方法研究胚胎学的极力推崇者，他于 1893 年发展了 Roux 的实验。他采用分离实验(isolation experiment)的方法，即通过剧烈摇晃将海胆胚胎裂球分开培养，结果 2－细胞期分开的两个裂球都能发育成完整幼虫。Driesch 还证明：甚至在 4－细胞期时，4 个分开的海胆胚胎裂球也能发育成长腕幼虫(pluteus)。Driesch 的实验表明：2－或 4－细胞期时，分开的海胆胚胎裂球不是自我分化成胚胎的某一部分，而是通过调整发育成一个完整的有机体。这一类型的发育称为调整型发育。

Roux 和 Driesch 实验方法和结果的比较见表 7.1。Driesch 的裂球分离实验结果和 Weismann 假说预期结果或 Roux 的缺损实验结果均不一致。Driesch 实验表明：胚胎细胞核在卵裂过程中并未出现本质上的差异，不存在所谓核决定子不均等分布现象。

表 7.1 Roux 和 Driesch 实验方法和结果比较

研 究 者	有 机 体	实验类型	结 论	对潜能和命运的解释
Roux(1888)	蛙(*Rana fusca*)	缺损	镶嵌型发育(自主型)	预期潜能等于预期命运
Driesch(1892)	海胆(*Echinus microtuberculatus*)	分离	调整型发育(有条件)	预期潜能大于预期命运
Driesch(1893)	海胆(*Echinus* 和 *Paracentrotus*)	组合	调整型发育(有条件)	预期潜能大于预期命运

海胆受精卵头两次卵裂为经裂，第三次卵裂为纬裂。第三次卵裂后，胚胎的 8 个细胞分为动物极 4 个裂球和植物极 4 个裂球。Driesch 于 1893 年将海胆卵放在两块玻璃片之间轻轻挤压，改变第三次分裂面，使第三次卵裂由纬裂变为经裂，由此产生的 8 个胚胎细胞排列在一个水平面上。移去玻璃片之后，第四次卵裂呈纬裂。这样一来，正常情况下本该分配到内胚层中的细胞核可能分配到外胚层细胞中，本该产生背部结构的细胞核可能分配到腹部细胞中。如果确有核决定子发生分离，那么，由此发育成的胚胎应该是畸形的。但是，Driesch 仍然获得正常胚胎。由此可见，扰乱卵裂过程，使细胞核发生异常分布，并不影响胚胎正常发育。Driesch 由此得出结论：裂球在整体胚胎中的相对位置总体上可以决定其发育结果。

Driesch 的实验结果无论对胚胎学还是对其本人都产生了重大影响。首先，按 Weismann 假说或是按 Roux 的实验，裂球的预期潜能（prospective potency）即裂球在分离培养时可能形成的组织与其预定命运（prospective fate）即裂球在正常胚胎内能形成的组织是等同的。然而，Driesch 的实验表明：分离裂球的预期潜能大于预期命运。其次，Driesch 认为：海胆胚胎是一个和谐等能系统（harmonious equipotential system），它把能独立自主发育成完整胚胎的各部分组织在一起协调作用发育成单个完整的有机体。再者，Driesch 认为：细胞核在胚胎发育中的命运只取决于它在胚胎内的位置。在此基础上，Driesch 提出了发育过程中细胞核和细胞质相互作用假说：

"就含有的细胞核而言，在个体发生中每个细胞都携带有全部原基；就含有的特定细胞质而言，每个细胞都受特定细胞质的影响而产生唯一的特异反应……当核物质被激活时，并随即在其指导下，最先影响核物质的细胞质又发生改变，并因此确立了下一个新的发育过程的基础；新的发育过程不仅是原因而且是结果。"

一些学者尤其是 Oscar Hertwig 于 1894 年成功地把 Driesch 的实验并入到更为先进的实验胚胎学中。虽然 Driesch 后来所主张的"生机论"是唯心主义的虚构，但是他有关海胆胚胎裂球分离实验的结果却是正确的。海胆胚胎基本上呈调整型发育。当代实验胚胎学研究结果表明：在兔子或小鼠胚胎 2－细胞期，毁坏其中一个裂球后，移植到养母子宫内，胚胎也能正常发育。细胞融合实验也证明哺乳动物胚胎发育具有调整能力。两个或更多个小鼠或大鼠早期胚胎融合后，仍能正常发育。可见，虽然 Weismann 和 Roux 是开创发育生理学（developmental physiology）研究的先驱者，但是 Driesch 有关海胆裂球分离和压板改变分裂面的实验结果说明：Weismann 和 Roux 两人有关细胞分化是核决定子不均等分离引起的假设是错误的。

四、Sven Hörstadius：双梯度模型

虽然 Weismann 和 Roux 关于细胞分化是由核决定子不均等分离引起的假设是错误的，但是，Driesch 裂球分离实验所得的结论也不是百分之百正确。如前一章所述，许多动物胚胎在很大程度上呈镶嵌型发育，即使海胆胚胎也不是由完全等能的细胞组成的集合体，不是百分之百呈调整型发育。Sven Hörstadius 从 1928 到 1935 这 7 年多时间里开展了一系列实验，把早期海胆胚胎不同胚层细胞用玻璃针分开，分别观察它们的发育命运。当 8－细胞期胚胎沿动植物极轴一分为二时，如同 Driesch 预言那样，两部分都能发育成长腕幼虫。但是，当同期海胆胚胎沿赤道分开成动物极和植物极两部分时，两部分都不能发育成完整幼虫。动物极部分发育成具纤毛的囊泡，称为永久囊胚（permanent blastula）；植物极部分发育成具有膨大消化管的不正常幼虫（图 7.3）。Hörstadius 还将海胆未受精卵沿赤道切割成动物极和植物极两部分，然后使其受精发育，获得了和分离实验相似的结果。海胆卵片（merogone）只要具有单倍体核就能分裂发育，如精子进入无核卵片后，卵片可以

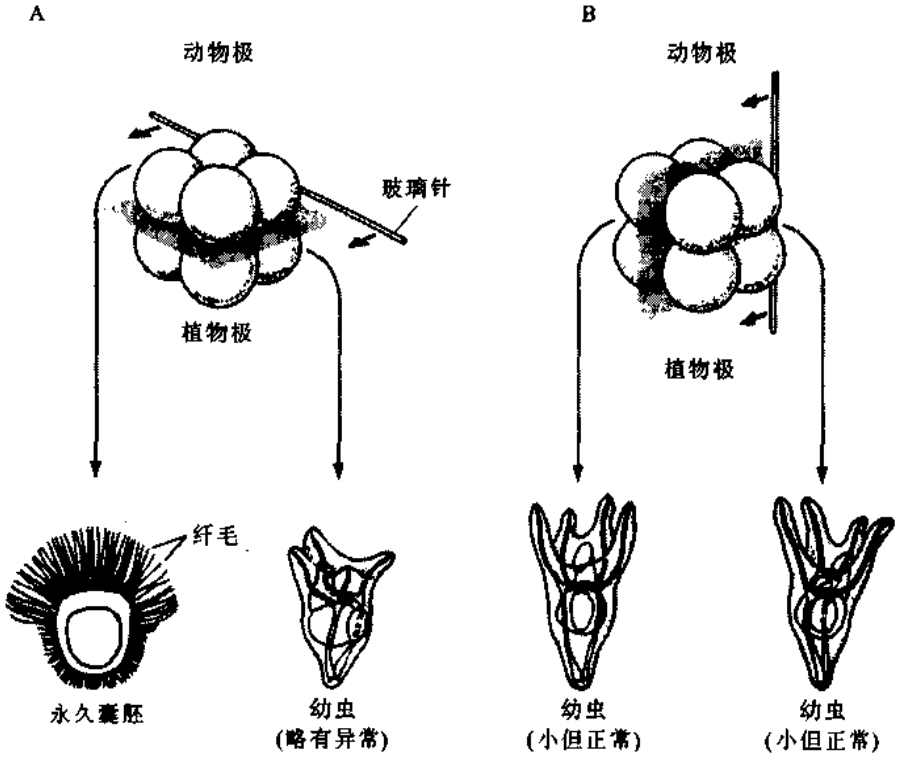


图 7.3 海胆胚胎的早期不对称性

A. 动物极 4 裂球和植物极 4 裂球分开培养，动物极形成具纤毛的永久囊胚，而植物极形成具有膨大消化管的幼虫

B. 8－细胞期沿动植物极轴一分为二，每部分都同时具有动物极细胞和植物极细胞，都能形成正常小幼虫

分裂发育。当卵子沿动植物极轴切开时，受精后两部分都能形成正常胚胎。但是，当卵子沿赤道切开时，受精后动物极一半发育成永久囊胚，而植物极一半发育成具膨大消化管的不正常幼虫(图 7.4)。可见，海胆胚胎在一定程度上呈镶嵌型发育，至少沿动植物极轴是如此。Maruyama 等将海胆卵子一分为二，也发现受精后只有植物极一半能形成小裂球和进行原肠作用。因此，决定小裂球形成和原肠作用的因子似乎位于卵子植物极部分。同样，Zhang 等(1990)也证明在海星中决定原肠形成的因子位于卵母细胞植物极半球。

上述观察结果促使 Hörstadius 开展胚胎学发展史上一些最令人激动的实验。首先，Hörstadius (1935)追踪海胆 64－细胞期胚胎的六层细胞中每一层细胞的正常发育命运。他发现：正常情况下，海胆 64－细胞期胚胎中的动物极细胞和植物极第一层(veg_1)细胞形成外胚层，植物极第二层(veg_2)细胞形成内胚层，而小裂球则形成中胚层骨骼(图 7.5)。

接下来，Hörstadius 除去海胆 64－细胞期胚胎的受精膜，用细玻璃针把不同的细胞层分开，单独培养或按不同组合方式把分离的细胞层重组培养。分离的动物极半球细胞单独培养时形成具纤毛的永久囊胚。这样的胚胎称为动物极化(animalization)胚胎。当把动物极半球细胞和 veg_1 细胞重组时，发育形成的幼虫的动物极化程度相对减小：细胞表面纤毛的发育被抑制，胚胎产生部分消化管。当动物极半球细胞和 veg_2 细胞重组时，形成一个外形正常的长腕幼虫。在这种组合里，正常情况下只形成原肠及其衍生物的 veg_2 细胞可以发育成骨骼。同样，当动物极半球细胞只和小裂球重组时，也形成外形正常的长腕幼虫；在这种组合里，内胚层完全由动物极细胞发育而来。从这些实验可以看出：小裂球比 veg_2 细胞具有更强的抑制动物极化或导致植物极化(vegetalization)的

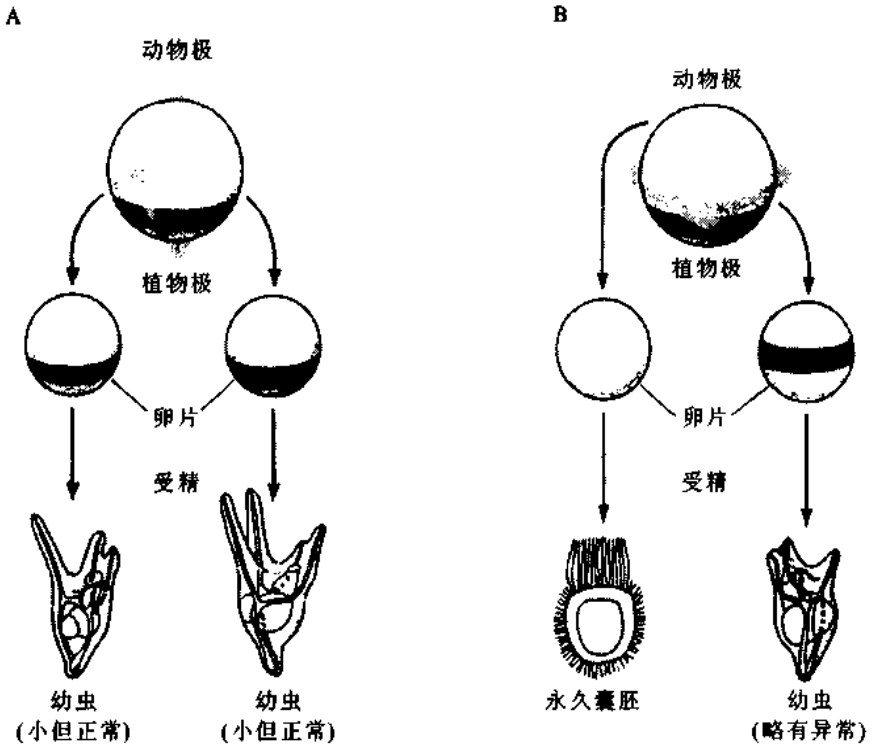


图 7.4　海胆卵子的不对称性

A. 沿动植物极轴一分为二的两块卵片，受精后都能形成长腕幼虫　B. 沿赤道一分为二的两块卵片，受精后动物极部分形成具纤毛的永久囊胚，而植物极部分形成具有膨大消化管的幼虫

能力，而 veg_2 细胞又比 veg_1 细胞具有更强的植物极化能力。总而言之，海胆胚胎中植物极化(抑制动物极化)的能力是呈梯度分布的，其强度从植物极到动物极逐渐递减。

Hörstadius 还把海胆胚胎小裂球和 64－细胞期胚胎的不同细胞层分别组合，证明海胆胚胎中不仅存在动物极化因子，而且动物极化因子也呈梯度分布。分离的 an_1 和 an_2 细胞单独培养时都形成永久囊胚。但是，当 an_1 细胞和 4 个小裂球组合时，可以发育成正常幼虫，而 an_2 细胞只要和 2 个裂球组合就能发育成正常幼虫。当 an_2 细胞和 4 个小裂球组合时，发育的幼虫具有膨大的消化管。veg_1 细胞单独培养时，也形成永久囊胚。但是，当 veg_1 层细胞和 1 个小裂球组合时，发育的幼虫消化管异常膨大。至于 veg_2 细胞，根本不需要和小裂球配合，发育就具有植物极化趋势(图 7.6)。由此可见：海胆胚胎中存在一个动物极化梯度，其强度从动物极 an_1 细胞至植物极小裂球逐渐递减。

综上所述，在海胆胚胎中存在着两个彼此相对的梯度：植物极化梯度和动物极化梯度。植物极化梯度在植物极活性最大，动物极化梯度在动物极活性最大。海胆胚胎的正常发育依赖于动物极化梯度和植物极化梯度两者之间的适当平衡，而不依赖于它们的绝对强度大小。两个梯度之间的不同组合建立起各种中间状态(图 7.7)。只要两个梯度强度是平衡的，胚胎就能正常发育。双梯度模型在解释裂球组合实验时非常有用。例如，当小裂球移植到 32－细胞期胚胎的中间位置时，移植的小裂球下陷进入受体囊胚腔，形成充分发育的次生原肠(secondary archenteron)；而当小裂球移植到动物极时，只形成很小的次生原肠。迄今为止，尚未分离出动物极化因子或者植物极化因

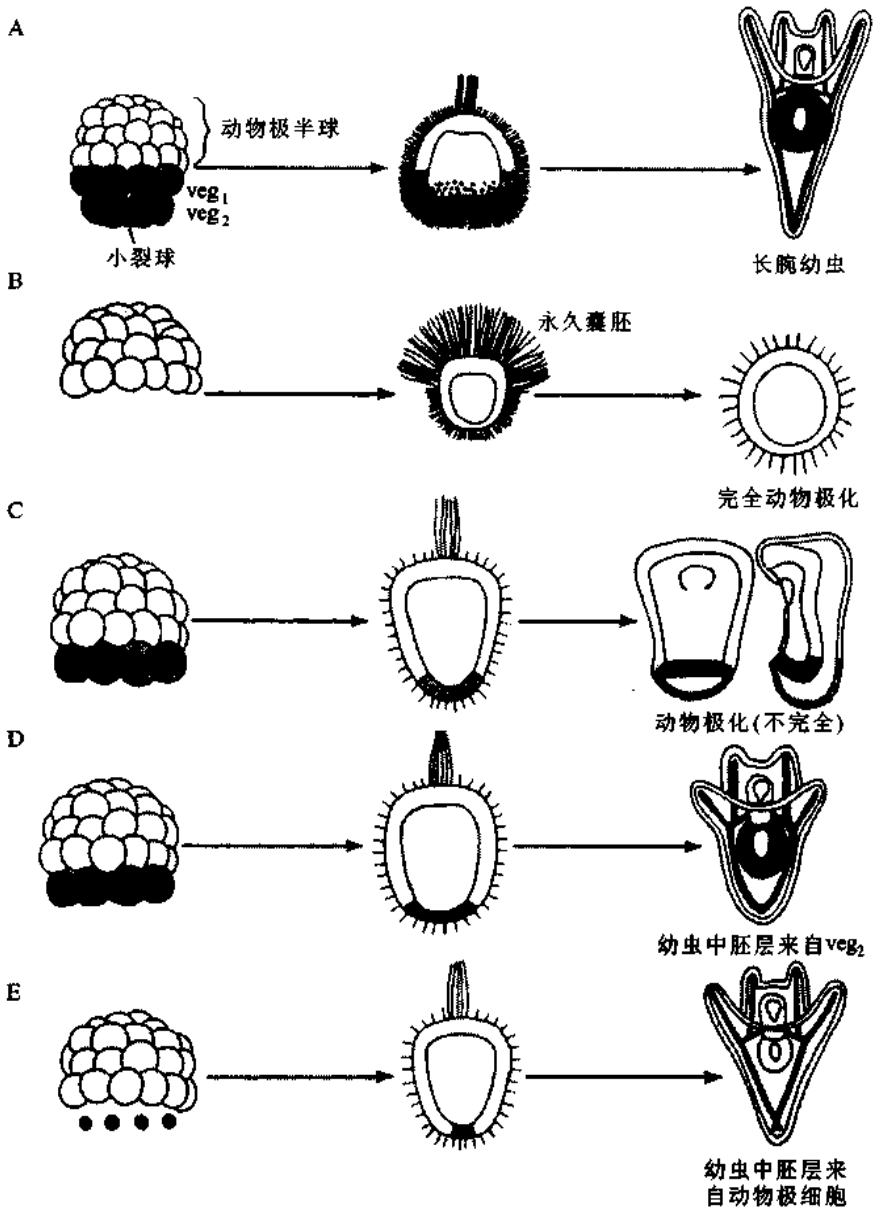


图 7.5 Hörstadius 所示的植物极梯度

A. 海胆胚胎 64 - 细胞期每层裂球在囊胚和长腕幼虫中的发育命运 B. 分离的动物极半球的发育命运 C. 动物极半球和 veg_1 细胞组合的发育 D. 动物极半球和 veg_2 细胞组合的发育 E. 动物极半球和小裂球组合的发育

子。蛋白质抑制剂如重金属、NaSCN 和染料伊万斯蓝(Evans blue)等可以减弱植物极化因子的作用，从而使胚胎朝向动物极化方向发育。而呼吸抑制剂如 CO、KCN、NaN_3 和 Li^+ 等可以减弱动物极化因子的作用，从而使胚胎朝向植物极化方向发育。Ubisch 于 1919 年将分离的动物极半球细胞放在氯化锂溶液中培养，获得正常的长腕幼虫。显然，锂可以弱化动物极细胞的动物极化梯度，从而使动物极半球细胞能平衡发育。

这样一来，我们便有了一个基于卵内物质相对浓度梯度建立起来的调整型发育模型。当动物

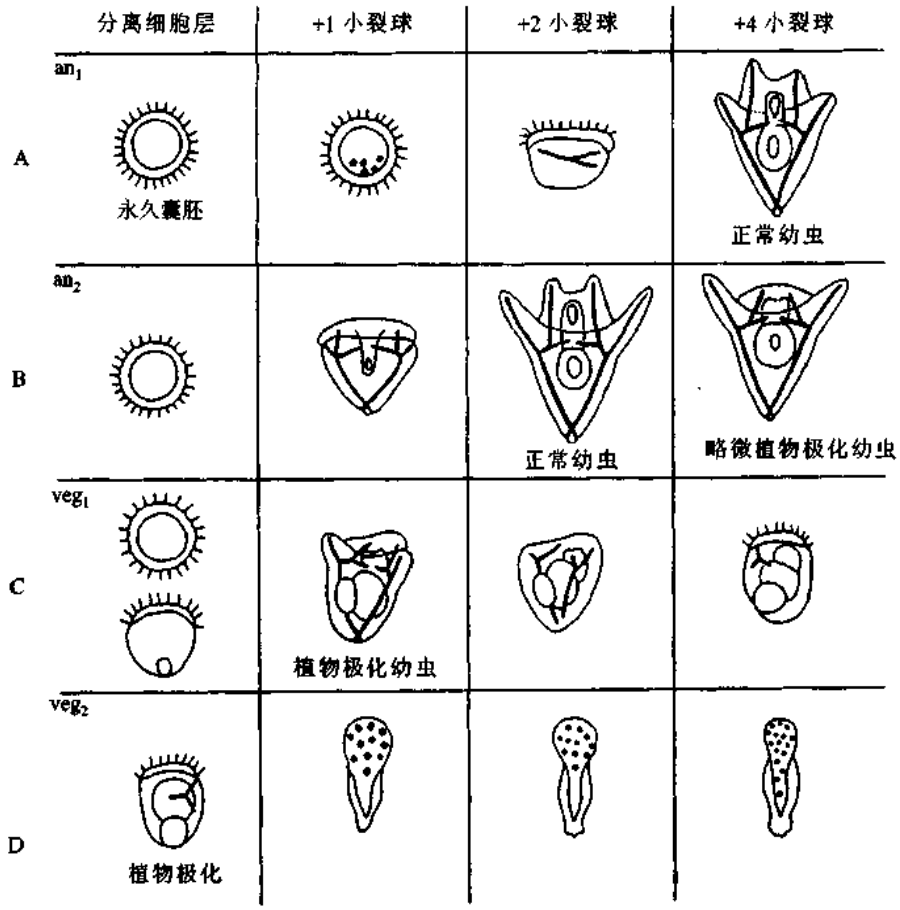


图 7.6　Hörstadius 所示的动物极化梯度

在海胆胚胎 32－细胞期，将每一层细胞分离，再分别和 0、1、2 和 4 个小裂球组合。和 an_1 细胞组合需 4 个小裂球才能形成正常幼虫(A)；和 an_2 细胞组合，仅需 2 个小裂球就能形成正常幼虫(B)；veg_1 细胞和 1 个小裂球组合即形成植物极化幼虫(C)；veg_2 细胞缺乏形成正常幼虫的足够动物极特性(D)

极细胞和小裂球组合时，形成正常长腕幼虫。长腕幼虫的消化管细胞来自正常情况下只发育成外胚层的动物极细胞。可见，动物极细胞的发育潜能大于预期命运。但是，动物极细胞单独培养时，只能发育成永久囊胚，就是说动物极细胞形成完整幼虫的能力已经消失。换言之，动物极细胞的发育潜能受到了限制。细胞分化取决于它所含的动物极物质和植物极物质的比例。动物极细胞因所含的动物极化因子远比植物极化因子强大，所以正常情况下只发育成外胚层组织。当动物极细胞和具有最强植物极化因子的裂球组合时，某些动物极细胞便形成消化管组织。当胚胎沿动植物极轴分开后，两部分均含有平衡的动物极化因子和植物极化因子，故而都能形成正常幼虫。裂球的预期命运只要还未决定，都是可以调整的。裂球的发育命运一旦由于动物极细胞质和植物极细胞质彼此分离而决定下来，便失去调整能力。海胆胚胎在 32－细胞期以后，多数裂球便不能再形成完整幼虫，而小裂球在 16－细胞期时便已失去形成完整幼虫的能力。这都是由于动物极细胞质和植物极细胞质彼此分离的结果。因此，即使在调整型发育的胚胎中，总会从某一时期开始，胚胎细胞的发育潜能逐渐受到限制。

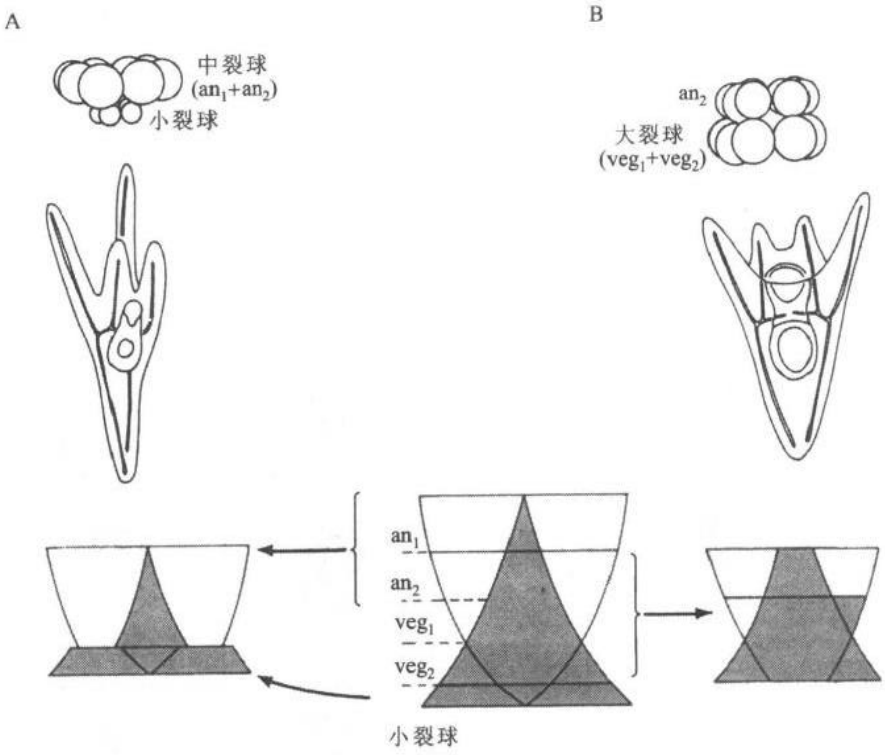


图 7.7 由海胆胚胎 32－细胞期两极细胞和中间两层细胞形成的长腕幼虫

A. 小裂球加到中裂球(an_1 + an_2)上 B. an_2 细胞层和大裂球(未来的 veg_1 和 veg_2)相加，两极细胞均不存在。上述两种组合都能形成正常幼虫。胚胎下方的图示假设的梯度

第二节 两栖类发育调控

一、胚胎细胞的渐进决定

从海胆早期胚胎发育中我们已经注意到：即使在呈调整型发育的胚胎中，裂球的发育命运总会从某一时刻开始逐渐受到限制。Hörstadius 发现海胆胚胎裂球只有在含有足够的动物极细胞质和植物极细胞质时，才具有调整能力，从而把裂球发育潜能的限制和卵裂平面联系起来。1918 年，Hans Spemann 发现蝾螈胚胎裂球的发育情形和海胆的颇为相似。他和他的同事们在以后 20 多年时间里，对蝾螈胚胎裂球的发育命运进行不断的实验分析，奠定了今天大部分胚胎生理学知识的基础，Spemann 本人也因此而获得 1935 年的诺贝尔奖。

同 Roux 和 Driesch 一样，Spemann 也曾试图验证 Weismann 的假说。他用发环沿动植物极并且和第一次卵裂平行的平面套住刚刚受精的蝾螈(*Triturus taeniatus*)卵子，然后把卵子结扎成两部分，使细胞核只在其中一部分内分裂。待有核部分分裂到 16 细胞时，放进一个细胞核到无核部分，无核部分便开始分裂。紧接着，将套索拉紧，使两部分完全分开。这样，从一个卵可以长出两个幼体，其中一个年龄较另一个稍大些(图 7.8)。由此，Spemann 证明：两栖类早期胚胎的细胞核具

有遗传等同性，每个细胞核都能产生完整的有机体。

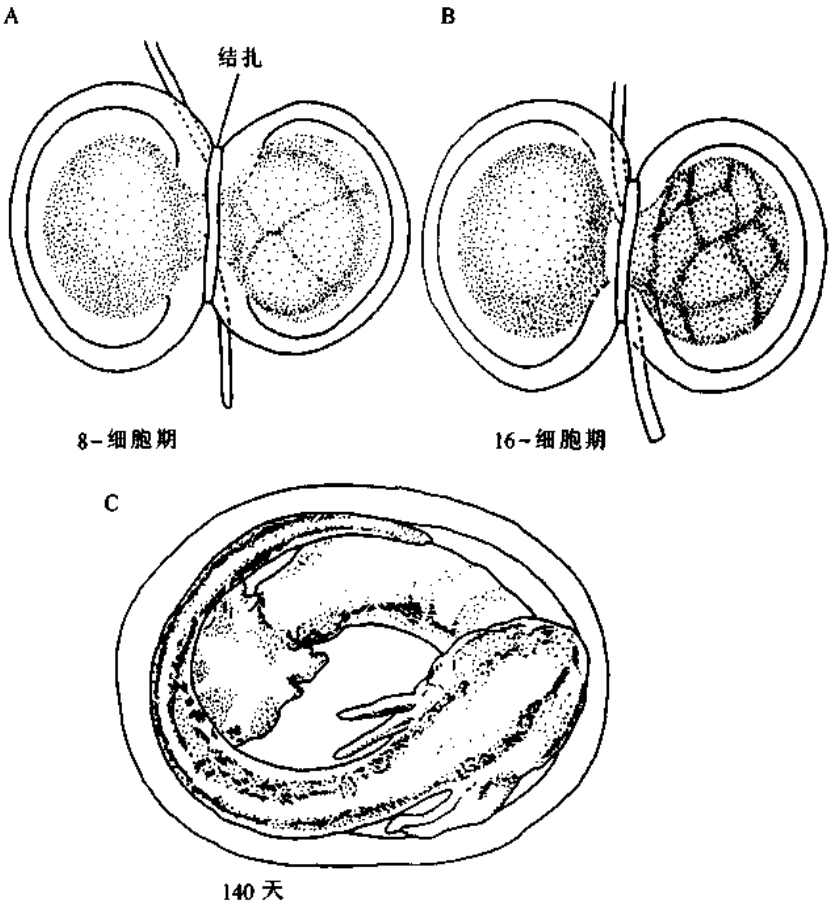


图 7.8　Spemann 所示的蝾螈卵裂期的核等同性

A. 蝾螈受精卵结扎后，核位于其中一部分中；有核部分已分裂形成 8 个细胞，而无核部分仍未分裂　B. 待有核部分分裂形成 16 细胞时，向尚未分裂的部分放进一个细胞核，接着把胚胎结扎分成两个部分　C. 140 天后，每一部分都长成正常的幼体

但是，当 Spemann 沿动植物极轴并且和第一次卵裂面垂直的平面结扎时，他得到了完全不同的结果：细胞核在两部分都能分裂，但其中只有一部分能形成正常幼体，而另一部分只发育成没有任何组织结构的细胞块，Spemann 称之为腹块（belly piece）。腹块的外层由表皮细胞组成，内部包含有血细胞、间质细胞和消化管细胞，但是没有神经系统、脊索和肌节。

为什么两个相似的实验却得出两个截然不同的实验结果？可不可能是由于沿和第一次卵裂面垂直的平面结扎卵子时，某些细胞质不均等地分配到两部分之中造成的？事实确实如此。两栖类（如蝾螈）的卵子受精后，皮层细胞质发生剧烈运动。由于皮层细胞质的运动，卵子在纳精点对面区域色素减少，形成一个新月形的灰色区域即灰色新月。正常情况下，第一次卵裂面经过新月区，并把灰色新月物质一分为二，均等地分到两个裂球中。这时，把两个裂球分开，两者都能形成完整幼体。当第一次卵裂面不规则（自然条件下偶然出现或者人为地沿和第一次卵裂面垂直的平面结扎卵子）时，灰色新月物质就只分配到一个裂球中。Spemann 发现：如果将这样的两个裂球分开，只有

含灰色新月的裂球才能正常发育(图 7.9)。显然，灰色新月区域的某些物质是胚胎正常发育必不可少的。但是，它是如何发生作用的？在胚胎正常发育中，它起什么作用？原来，灰色新月区所形成的细胞将来组成胚胎胚孔的背唇。胚孔背唇细胞注定要向囊胚腔内陷，从而发动原肠作用并形成原肠。两栖类胚胎未来的一切发育分化都依赖于原肠作用时迁移到一定位置的细胞的相互作用。据此，Spemann 推测：① 灰色新月区域物质的重要性在于它具有发动原肠作用的能力；② 胚胎发育的关键性变化就发生在原肠作用过程中。

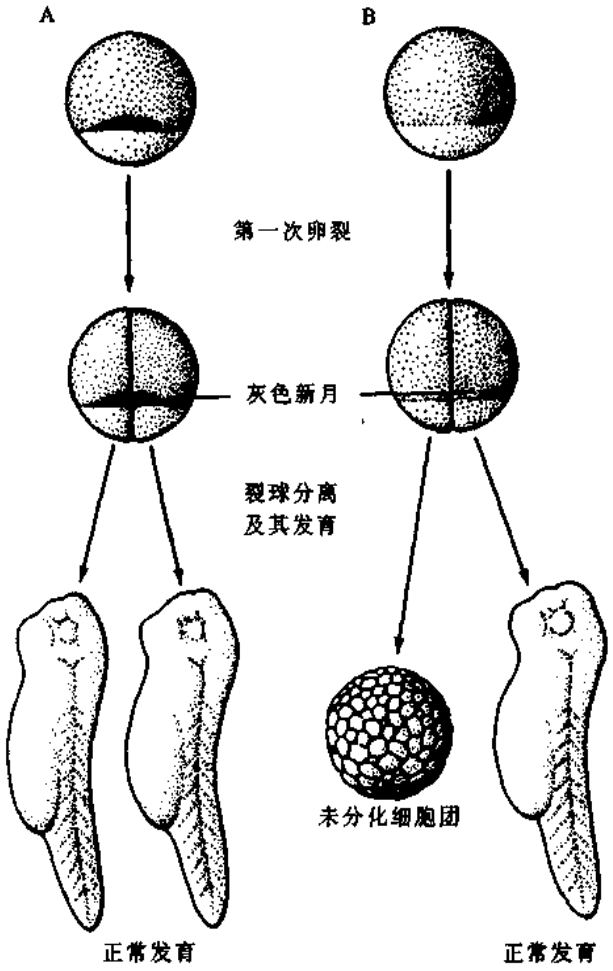


图 7.9 两栖类卵子的不对称性

A. 第一次卵裂把受精卵分成两个裂球；每个裂球都含有一半灰色新月，分开后都能形成正常胚胎 B. 第一次卵裂后，只有一个裂球含有灰色新月；把两个裂球分开后，只有含灰色新月的裂球能形成正常胚胎，另一裂球形成腹块

1918 年，Spemann 证明：细胞发育潜能的诸多变化确实发生在原肠作用过程中。将具有不同色素的两种蝾螈早期原肠胚细胞相互交换，当预期表皮细胞移植到预定形成神经板的位置时，所移植细胞发育成神经组织；当预期神经细胞移植到预定形成腹部表皮的位置时，所移植细胞发育成表皮(图 7.10A)。可见，蝾螈早期原肠胚细胞的发育命运尚未决定，它们的预期潜能大于预期命运。

在早期原肠胚时所移植的细胞表现为依赖型发育(dependent development),它们的最终发育命运完全取决于它们在胚胎中所处的位置。不过,在晚期原肠胚上进行同样的种间移植实验时,所得结果截然不同(图 7.10B,表 7.2)。所移植细胞不再根据它们在胚胎内所处的位置调整分化,而是表现为自主型发育(independent development)。具体说,预期神经细胞即便移植到预定形成表皮的位置仍发育成神经组织;预期表皮细胞即便移植到预定形成神经板的位置仍发育成为表皮。换言之,晚期原肠细胞的预期命运已经决定,它们的发育命运不再因所处位置不同而改变。因此,在由早期原肠胚向晚期原肠胚过渡期内,细胞的发育潜能逐渐受到限制。晚期原肠胚细胞只能朝某一预定方向分化。只能朝某一预定方向发育的细胞称为已决定细胞(determined cells)。决定系指细胞定型,最终分化成某一特定类型的细胞,而不是其他类型的细胞。应该指出的是:细胞决定的标准完全是实验性(手术性)的,细胞内并无任何明显变化。决定的分子基础仍是当今发育生物学中一个重要的未解之谜。

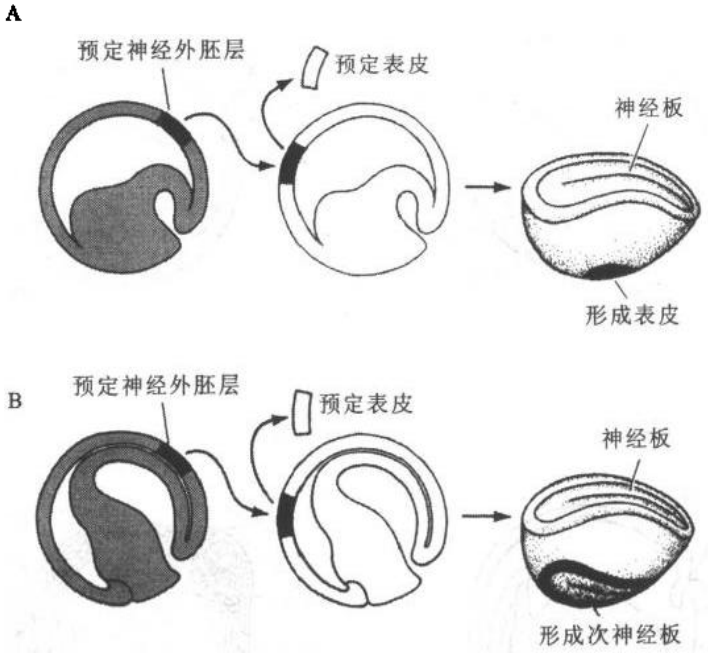


图 7.10　蝾螈原肠作用时外胚层的决定

A. 早期原肠胚时,将蝾螈预定神经外胚层细胞移植到另一胚胎预定形成表皮区域,预定神经外胚层细胞发育成表皮,受体胚胎中只能见到一个神经板　B. 晚期神经胚进行同样移植,预定神经外胚层细胞形成神经组织,受体胚胎中能见到两个神经板

表 7.2　蝾螈早期和晚期原肠胚移植实验结果比较

供　体　区	受　体　区	受体组织的分化	结　　论
早期原肠			
预期神经细胞	预期表皮	表皮细胞	依赖型发育
预期表皮细胞	预期神经	神经细胞	依赖型发育
晚期原肠			
预期神经细胞	预期表皮	神经细胞	自主型发育
预期表皮细胞	预期神经	表皮细胞	自主型发育

二、初级胚胎诱导

胚胎一个区域对另一个区域发生影响，并使后者沿着一条新途径分化的作用叫诱导(induction)。动物胚胎发育过程中存在许多诱导作用，其中脊索中胚层诱导外胚层细胞分化成神经组织这一关键的胚胎诱导作用称为初级胚胎诱导(primary embryonic induction)。其实，初级胚胎诱导是一个经典的实验胚胎学概念，它经常引起一些混乱，因为脊索中胚层诱导上面覆盖的外胚层细胞形成神经组织并不是胚胎发育中首先出现的诱导作用。但是，由于初级胚胎诱导一词沿用已久，人们早就习惯于这样使用了，所以至今一直沿用。下面，主要介绍初级胚胎诱导作用。

Spemann 和 Mangold(1924)证明：两栖类早期胚胎胚孔的背唇不但是唯一能自我分化的区域，而且能诱发原肠作用，并影响周围细胞的发育分化。他们选择两种具有不同色素的蝾螈胚胎，即色

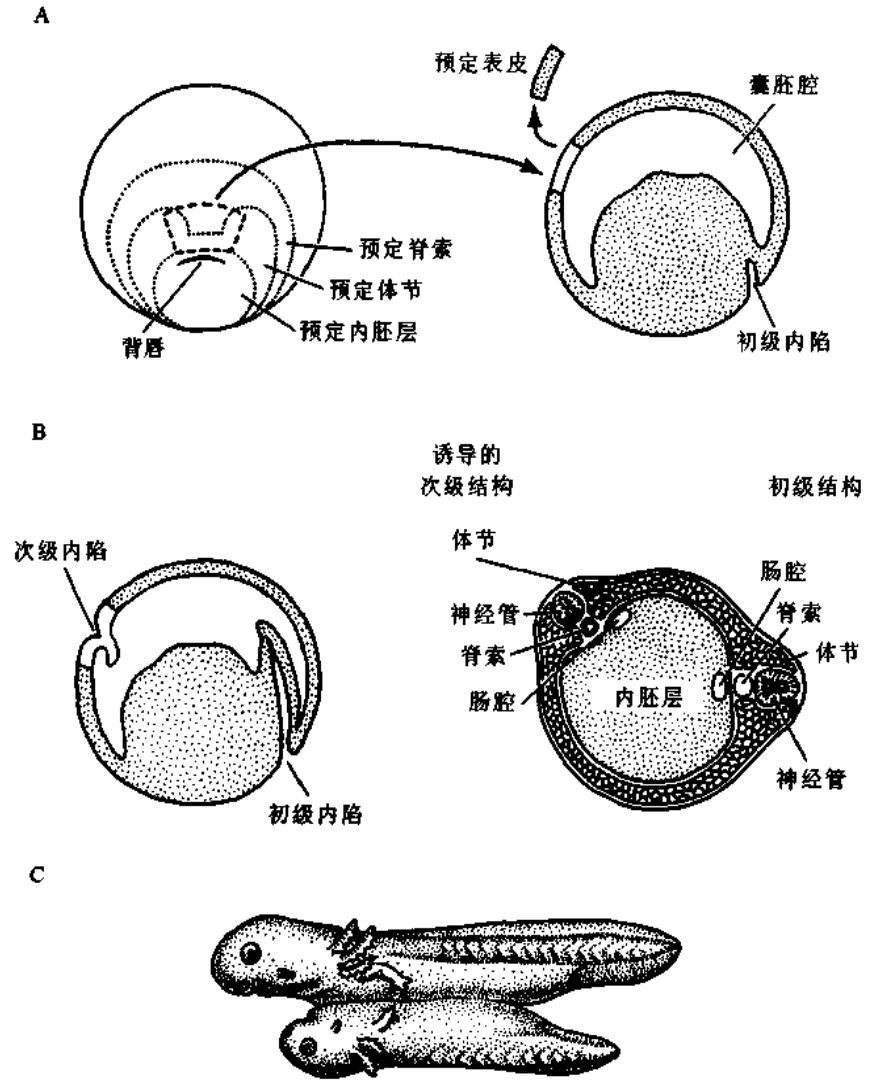


图 7.11 背唇组织的自我分化

A. 早期原肠胚的背唇移植到另一早期原肠胚的腹部表皮区 B. 组织内陷形成次级原肠和次级胚轴。在次生胚胎神经管、脊索和体节中，既有供体(黑色)组织又有受体(白色)组织 C. 最终形成连体胚胎

素较深的 *Triturus taeniatus* 和色素较浅的 *Triturus cristatus* 的胚胎，进行种间移植实验，很容易根据色素的深浅区分受体组织和供体组织。将 *T. taeniatus* 早期原肠胚的胚孔背唇（背部缘区）移植到 *T. cristatus* 同期胚胎预定形成腹部表皮的位置时，被移植的早期原肠胚胚孔背唇不像被移植的早期原肠胚的其他部分根据在胚胎中所处的新位置发育成表皮，而是如同其在原有位置一样向内陷入，并自我分化成脊索中胚层以及其他中胚层结构。这些结构都是供体在原位本该形成的组织。随着所移植胚孔背唇形成脊索中胚层，受体细胞开始参与形成一个新的胚胎，并发育成正常情况下从不形成的组织。因此，经常可以看到肌节一部分是浅色的（来自受体），而另一部分是深色的（来自供体）。更有趣的是，供体形成的脊索中胚层能诱导上面覆盖的外胚层细胞形成完整的神经组织，结果是所移植的胚孔背唇能诱导产生一个和受体胚胎面对面并列的次生胚胎（secondary embryo）（图 7.11）。因此，Spemann 和 Mangold 把胚孔背唇称为组织者（organizer）。用具有不同细胞核标记的胚胎重复 Spemann 和 Mangold 的实验，进一步证实了 Spemann 和 Mangold 的结果。

已有资料还表明：胚孔背唇在文昌鱼、圆口动物和各种两栖类胚胎中都能组织次生胚胎的形成。鸟类和哺乳类发动原肠作用的区域原条（primitive streak）前端即亨氏结（Hensen's node）亦能组织一个次生胚胎的形成（图 7.12）。

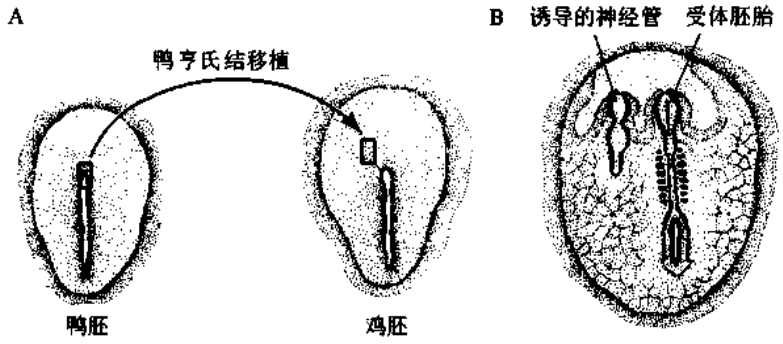


图 7.12　亨氏结诱导形成新胚轴

A. 从鸭胚胎取下的亨氏结移植到鸡胚上　　B. 在鸡胚移植区产生一个额外的神经管

第三节　Nieuwkoop 中心

初级胚胎诱导作用第一阶段发生在受精时。未受精卵围绕动植物极呈辐射对称状态；精子入卵，导致相对于卵子皮层的卵子内层细胞质（inner cytoplasm）旋转，打破了卵子的辐射对称性，由此形成两侧对称。精子入卵点对面的植物极裂球中，由于动物极和植物极细胞质的混合导致裂球内部背部化决定子（dorsalizing determinants）激活。这些含有已激活的背部化决定子的植物极细胞称为 Nieuwkoop 中心（Nieuwkoop center）。在初级胚胎诱导作用第二阶段，背部化的植物极细胞后裔诱导它上面的细胞形成 Spemann－Mangold 组织者（Spemann－Mangold organizer）；其余的植物极细胞诱导上面的缘区细胞（marginal cell）形成侧面和腹部中胚层。因此，在初级诱导之前即存在一个诱导作用。在初级胚胎诱导作用第三阶段，Speman－Mangold 组织者把毗连的中胚层变成背部中胚层，并指令背部外胚层形成神经组织。初级胚胎诱导的第四阶段包括使被诱导的神经组织出

现区域性特征(前脑、后脑和脊髓等)。

内胚层细胞能诱导上面的细胞成为中胚层。不仅如此，内胚层的极性也能转移给中胚层细胞。Nieuwkoop(1969，1973，1977)把囊胚赤道部分细胞除去，结果发现无论动物极极帽(animal cap)还是植物极极帽(vegetal cap)的细胞都不能产生中胚层组织。但是，把动物极极帽和植物极极帽组合起来时，动物极极帽细胞便被诱导形成中胚层结构，如脊索、肌肉、肾细胞和血细胞等。该诱导作用的极性即动物极极帽细胞是形成脊索还是形成肌肉等取决于内胚层细胞团的背腹极性。能诱导产生背部中胚层的因子被 Gerhart 等(1989)称为 Nieuwkoop 中心。在非洲爪蟾中，Nieuwkoop 中心位于囊胚背面最靠近植物极细胞(dorsalmost vegetal cell)中。

腹部和侧面植物极细胞也能诱导中胚层形成。背面最靠近植物极细胞诱导中轴中胚层(脊索和肌节)形成，而腹面和侧面植物极细胞则诱导中段中胚层(肌肉和间质)与腹中胚层(间质、血细胞和前肾)。

据认为，Nieuwkoop 中心的作用是激活上面中胚层细胞中一组编码转录因子的基因。现已发现有好几种转录因子是组织者特异性的，即它们仅限于在背唇及其最终形成的脊索中表达。XANF－1 和 Goosecoid 就是其中两种蛋白。

XANF－1 是一种含有 Goosecoid 同源序列的转录因子，可能是最早表达的转录因子之一。原肠作用开始时，XANF－1 主要在背唇深层细胞即头部中胚层前体中表达。把 *XANF－1* mRNA 注射到腹部裂球中能诱导次生胚轴的形成，注射了 *XANF－1* mRNA 的细胞成为次生胚轴的前端中胚层。因此，XANF－1 可能控制背唇深层细胞的迁移行为，并控制这些细胞分化为组织者。

Goosecoid 发挥作用的方式很像 XANF－*1*。20 世纪 90 年代初期，用在果蝇胚轴形成中具活性的基因探针筛选爪蟾背唇 cDNA 文库，从而发现了 *goosecoid* 信息。*goosecoid* 基因转录产物最早在晚期囊胚检测到，表明它可能是一个控制细胞核的基因。*goosecoid* 转录产物在紧位于背唇上面的区域即背中胚层前体细胞(C1 裂球)中不断积累。在动物极极帽培养物中，加入植物极特异性蛋白 Vg1 或者激活素都能诱导 *goosecoid* 基因转录，而加入生长因子 FGF2 或 Noggin 则不能诱导 *goosecoid* 基因转录。*goosecoid* mRNA 表达也和经实验处理的胚胎组织者区域相关：用 LiCl 增加缘区背前端具诱导作用的中胚层，*goosecoid* 表达也同时增加。相反，当受精卵在第 1 次分裂前经 UV 处理后，背前端中胚层诱导作用和 *goosecoid* 表达均被显著抑制。把全长的 *goosecoid* 信息注射到非洲爪蟾 4－细胞期胚胎腹部两裂球中，导致被注射裂球衍生的细胞内卷，并集中延伸，形成次生胚轴的背中胚层和头部中胚层。标记实验表明，注射过 *goosecoid* 信息的细胞还能够动员周围细胞加入次生胚轴的形成。因此，Nieuwkoop 中心激活 *goosecoid* 基因；*goosecoid* 编码一种 DNA 结合蛋白，不但能够激活背唇细胞的迁移特性(内卷和集中延伸)，而且能够自主决定表达 Goosecoid 蛋白的细胞形成头部内胚层或背部中胚层，还能够使 *goosecoid* 表达细胞动员周围细胞参与背轴形成。业已发现 Goosecoid 可以激活前端中胚层以及预定脑外胚层中的 *Xnot2* 基因。*Xnot2* 是非洲爪蟾中的 *orthodenticle* 同源基因；*orthodenticle* 基因在果蝇和小鼠脑的发育过程中都是不可或缺的。组织者特异性基因表达可以把早期组织者细分成含有不同信息组合的亚区(图 7.13)。原肠作用开始时，随着组织者细胞卷入胚胎内部，组织者构型发生变化。在深层细胞中，*goosecoid* 产物分布于由 C1 裂球衍生的细胞构成的最前端部分，尤其是脊索前板头部中胚层中。*Noggin* 和 *Xbra* 基因重叠表达区界定了预定形成后端内胚层范围。*Noggin* 基因另一个表达区域是前端神经板。

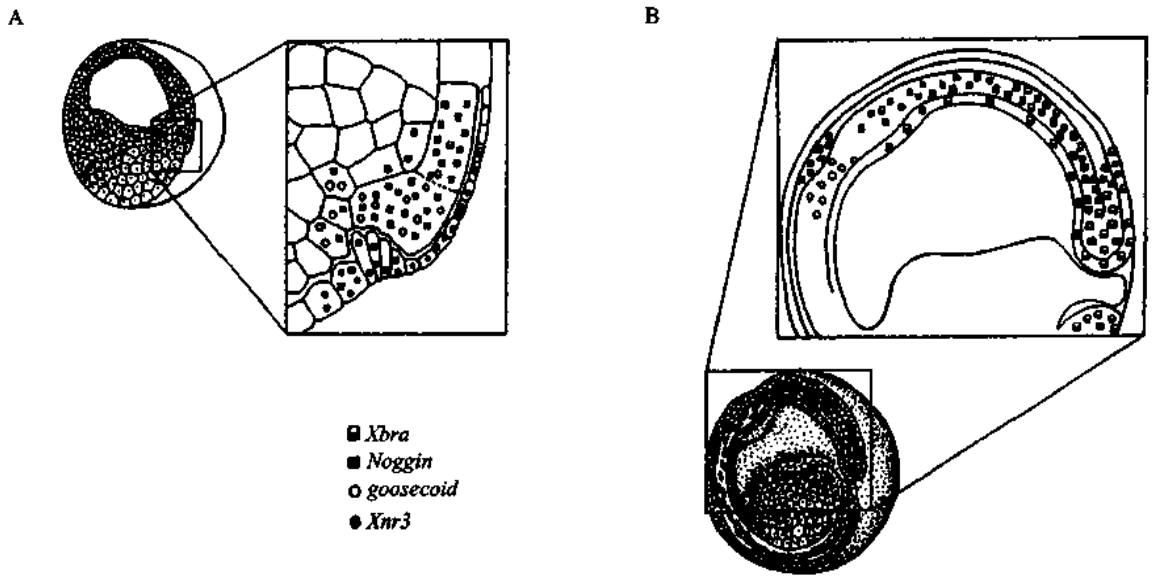


图 7.13　组织者的精细结构

A. 原肠作用开始时，*Xbra* 在位于组织者靠动物极细胞中表达，而 *Noggin* 在位于靠植物极细胞中表达。植物极细胞首先内卷，在胚胎内位于前端　B. 同样因子在原肠作用将要结束时的分布情况。表达区域更为明显，重叠减少、最初的细胞位置及后来基因表达图式不存在相关性

第四节　神经诱导

一、区域性差异的决定

神经诱导最有趣的现象之一是神经结构出现区域特异性，神经管前脑、后脑和脊柱尾部区域由前向后排列井井有条。因此，组织者不但诱导神经管而且对神经管区域进行规划。这种区域特异性诱导作用是由 Mangold(1933)发现的。她将刚刚完成原肠作用的蝾螈胚胎表面的神经板剥除，把露出的原肠顶壁取下来，从前到后切成 4 块，分别移植到早期原肠胚的囊胚腔内。结果表明：① 最前面一块原肠顶壁诱导产生平衡器和部分口器；② 紧接着的一块原肠顶壁诱导产生各种头部结构，包括鼻、眼睛、平衡器和听囊；③ 第三块原肠顶壁诱导产生后脑结构；④ 最后一块原肠顶壁诱导产生背部躯干(dorsal trunk)和尾部中胚层(图 7.14)。Bijtel(1931)和 Spofford(1945)也都证明了脊索后端对背部中胚层的诱导作用：神经板后端 1/5 产生尾部肌节和前肾后端部分。

把蝾螈早期原肠胚背唇移植到另一个早期原肠胚中，也能诱导形成一个次生头部。而把晚期原肠胚背唇移植到另一个早期原肠胚中，则诱导形成次生尾部。这意味着最早进入胚胎内的组织者细胞能诱导形成脑和头，而晚期原肠胚背唇的细胞则诱导上面细胞成为脊髓和尾。鸡胚中也存在类似诱导现象。

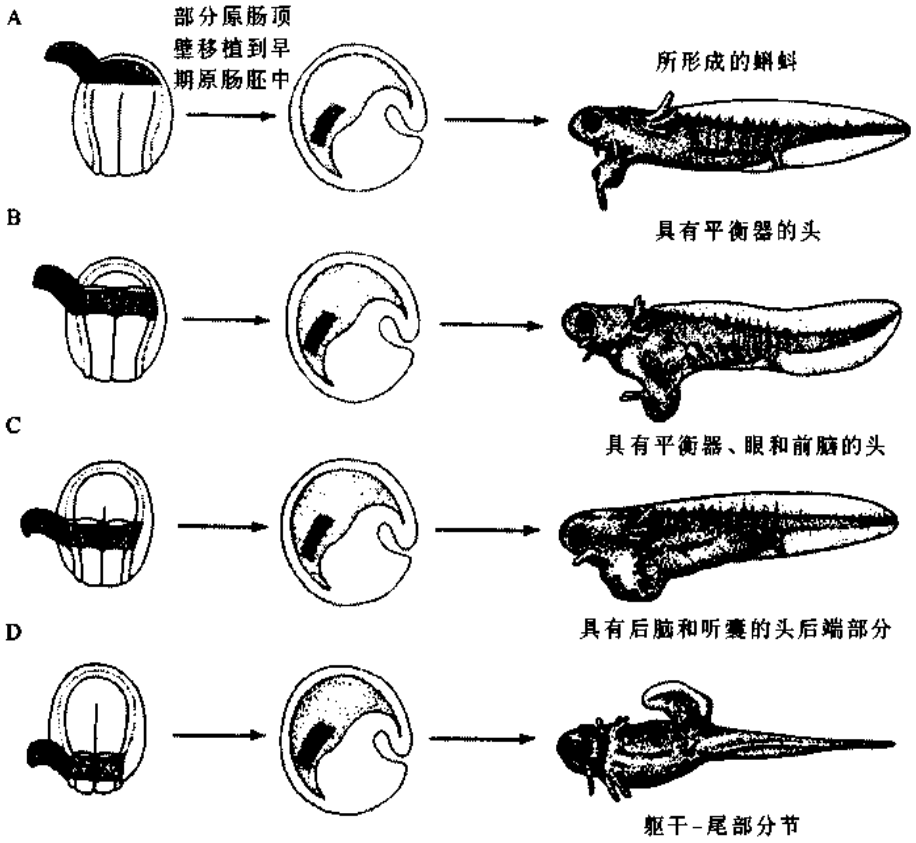


图 7.14 神经诱导的区域特异性

把一个胚胎原肠顶壁不同区域移植到蝾螈早期原肠胚，所发育幼虫具有某些次生结构

二、神经诱导模型：激动和转化

20 世纪 50 年代，Nieuwkoop 以及 Toivonen 和 Saxén 提出一个包括两个步骤的神经诱导区域特异性模型：第一步，组织者诱导产生神经组织，它属于原脑组织(archencephalic tissue)；第二步，由后端化信号(posteriorizing signal)产生诱导作用。后端化信号呈梯度性分布，尾部浓度最高。后端化信号作用于前端外胚层，使其转变为后脑和脊髓组织。Nieuwkoop 把反应态外胚层褶移植到受体胚胎前后轴不同位置上，发现靠近受体的外胚层褶部分产生插入区典型结构，而远离受体的外胚层褶部分则发育成更前端神经结构而不是插入区结构。有关人工组织特异性诱导者的研究也得出和 Nieuwkoop 相同的结论。豚鼠(guinea pig)骨髓(bone marrow)能诱导产生中胚层结构，而其肝则能诱导产生原脑结构。Toivonen 和 Saxén(1955)把豚鼠骨髓和肝一同移植到早期原肠胚的囊胚腔，发现可以诱导产生前脑、后脑、脊髓和躯干中胚层，比单独用骨髓或肝诱导时多出后脑和脊髓两个组织(图 7.15)。因此，神经诱导的区域特异性好像也受一个相互对抗的双梯度系统调控。这个双梯度系统一端是前脑诱导物浓度最大，另一端是脊髓诱导物浓度最大。把前端神经外胚层和不同数量后端背中胚层混合培养，其实验结果进一步证实了双梯度假说(图 7.16)。因此，整个神经组织先是决定成为原脑，接着通过尾部物质(caudal substance)以梯度方式使神经组织后端化。目前多数神经诱导模型都认为神经诱导作用包括激活(activation)和转化(transformation)两步：第一

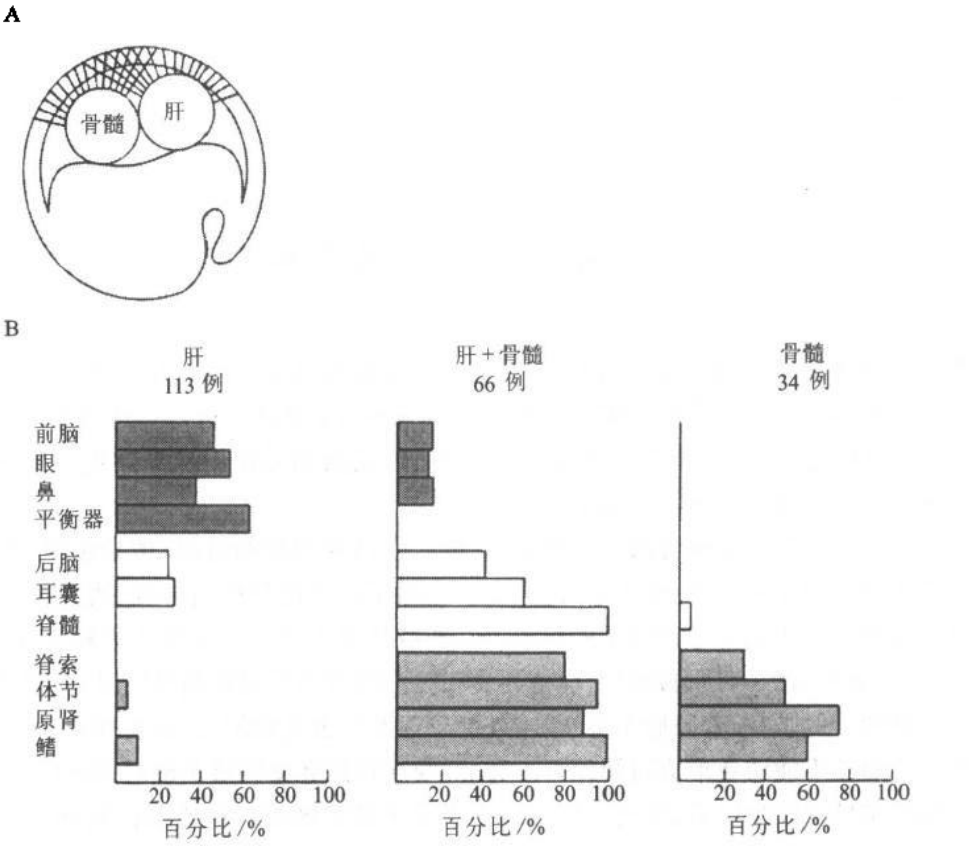


图 7.15 神经诱导模型

A. 把神经诱导者(豚鼠肝)和中胚层诱导者(豚鼠骨髓)同时埋植到蝾螈早期原肠胚囊胚腔中 B. 埋植实验结果。单独埋植神经诱导者或中胚层诱导者,都不能同时诱导形成后脑和脊髓结构(在神经板命运图谱上位于前脑和中胚层之间)。当同时埋植两者时,就能诱导形成后脑和脊髓结构

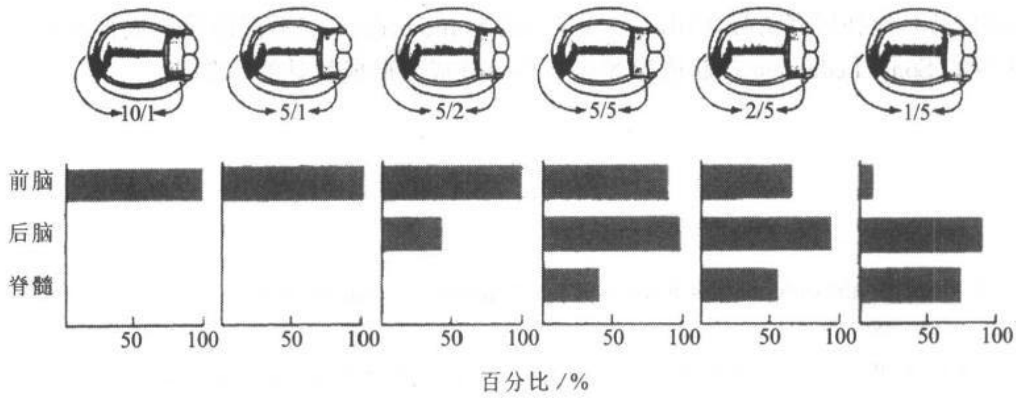


图 7.16 两栖类胚胎双梯度两步诱导作用证据

把神经板前端区域(即已经受到前脑诱导者自然诱导的细胞)和后端脊索细胞分割下来,按不同比例混合培养。形成中间结构(后脑)的频率随前端神经板细胞与中胚层细胞之间的比例的增加而增加。这表明神经系统的区域性特化发生在神经板细胞决定成为神经细胞之后

步的激活使细胞获得发育成为原脑的能力；第二步，后端中胚层的物质梯度使神经组织特化，逐渐出现后端结构。据认为，神经诱导分子 Chordin、Noggin 和 Follistatin 每一种都能诱导产生前端（前脑型）神经组织，而视黄酸、胚胎型 FGF 和 Wnt3a 则属于神经组织后端化或尾部化（caudalization）分子（详见第八章）。

第五节 反应能力和诱导级联反应

虽然胚胎初级诱导已经够复杂的了，但仍不足以构建起完整胚胎。不过，神经管、背中胚层、咽内胚层和其他组织的形成为胚胎发生进一步诱导作用创造了条件。进一步诱导作用建立在组织和组织相互作用基础之上，即一种组织通过和另一种组织之间相互作用从而决定其发育命运。这种诱导作用称为次级诱导（secondary induction）。

任何胚胎诱导系统至少包含两个组成部分：能产生诱导刺激的组织（诱导组织）和能接受并对诱导刺激产生反应的组织（反应组织）。前面主要介绍了诱导组织的特异性，现在再简要介绍一下反应组织的特异性。组织对一种特定的刺激以一种特异方式产生反应的能力称为反应能力（competence）。已经知道：在早期原肠胚中，埋植到囊胚腔内的背唇只要遇到外胚层，就能诱导形成新神经板和次生胚轴。但是，随着胚胎年龄增加，外胚层逐渐失去反应能力；至晚期神经胚时，在预定表皮下面埋植背唇已不能诱导形成新神经板。因此，晚期神经胚外胚层不能对背唇诱导产生反应，但能对其他“新”诱导者发生反应，且这种反应能力限定于特定区域。在原肠作用和早期神经胚形成过程中，头部外胚层（而非躯干外胚层）能形成晶体、鼻和耳基板。头部外胚层的这种反应能力是在前端神经板作用下而获得的。神经胚头部区域与视泡（来自前脑）接触能产生反应形成晶体。

不仅如此，一种组织一旦经受诱导作用之后，就可以对另外的组织产生诱导作用。Nieuwkoop 中心的 D1 裂球诱导上面的细胞成为神经管；神经管接着又诱导头部外胚层成为晶体。就这样，诱导作用一级一级继续。同时，一种组织可以对另外好几种组织产生诱导作用。组织者既对中胚层有诱导作用，又对外胚层有诱导作用。来自脊索的 Sonic hedgehog 不仅诱导形成神经管底板，而且与来自底板的 Sonic hedgehog 一起诱导腹面中央肌节成为形成软骨的生骨节。

参考文献

1 Bijtel J H. Über die Entwicklung des Schwanzes bei Amphibien. Wilhelm Roux Arch Entwicklungsmech. Org., 1931, 125: 448～486

2 Blitz I L, Cho K W. Anterior neurectoderm is progressively induced during gastrulation: the role of the Xenopus homeobox gene orthodenticle. Development, 1995, 121: 993～1 004

3 Fan C M, Tessier-Lavigne M. Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: Evidence for sclerotome induction by sonic hedgehog. Cell, 1994, 79: 1 175～1 186

4 Gerhart J C, *et al*. Cortical rotation of the *Xenopus* egg: Consequences for the anteroposterior pattern of embryonic dorsal development. Development (Suppl.), 1989, 107: 37～51

5 Gimlich R L, Cook J. Cell lineage and the induction of nervous systems in amphibian development. Nature, 1983,

306: 471～473

6 Henry J J, Grainger R M. Early tissue interactions leading to embryonic lens formation in *Xenopus laevis*. Dev. Biol., 1990, 141: 149～163

7 Mangold O. über die Induktionsfahigeit der verschiedenen Bezirke der Neurula von Urodelen. Naturwissenschaften, 1933, 21: 761～766

8 Niehrs C, *et al*. The homobox gene *goosecoid* controls cell migration in *Xenopus* embryos. Cell, 1993, 72: 491～503

9 Nieuwkoop P D. Activation and organization of the central nervous system in amphibians. Ⅲ. Syhnthesis of a new working hypothesis. J. Exp. Zool., 1952, 120: 83～108

10 Nieuwkoop P D. The formation of the mesoderm in urodele amphibians. Ⅰ. Induction by the endoderm. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org., 1969, 162: 341～373

11 Nieuwkoop P D. The "organization center" of the amphibian embryo: Its origin, spatial organisation and morphogenetic action. Adv. Morphogen., 1973, 10: 1～39

12 Nieuwkoop P D. Origin and establishment of embryonic polar axes in amphibian development. Curr. Top. Dev. Biol., 1977, 11: 115～132

13 Spemann H, Mangold H. Induction of embryonic primoordia by implantation of organizers from a different species. 1924. In: Willier B H, Oppenheimer J M. Foundations of Experimental Embryology. New York: Hafner, 1974, 144～184

14 Spofford W R. Observation on the posterior part of the neural plate in *Amblystoma*. J. Exp. Zool., 1945, 99: 35～52

15 Thomsen G H, Melton D A. Processed Vg1 protein is an axial mesoderm inducer in *Xenopus*. Cell, 1993, 74: 433～441

16 Toivonen S, Saxén L. The simultaneous inducing action of liver and bone marrow of the guinea pig in implantation and explantation experiments with embryos of *Triturus*. Exp. Cell Res. (Suppl.), 1955, 3: 346～357

17 Toivonen S, Saxén L. Morphogenetic interaction of presumptive neural and mesodermal cells mixed in different ratios. Science, 1968, 159: 539～540

18 Wilson E B. The Cell in Development and Inheritance. New York: Macmillan, 1896

19 Zaraisky A G, *et al*. The homeobox - containing gene *XANF - 1* may control development of the Spemann organizer. Development, 1995, 121: 3 839～3 847

20 Zhang S C, *et al*. Cytoplasmic regionalization in starfish oocyte: occurrence and localization of cytoplasmic determinants responsible for the formation of archenterons and primary mesenchyme in starfish (*Asterias amurensis*) oocytes. Chin. J. Oceanol. Limnol., 1990, 8: 263～272

第八章　胚轴形成

胚胎不但要产生不同类型的细胞，而且要由这些细胞构成功能性的组织和器官并形成有序空间结构的形体模式(body plan)。胚胎细胞形成不同组织、器官，构成有序空间结构的过程称为图式形成(pattern formation)。如人的手臂和腿，都由肌细胞、骨细胞和皮肤细胞等多种细胞构成，这些同样的细胞在手臂和腿的图式形成过程中却被构成具有显著差异的有序空间结构。在动物胚胎发育中，最初的图式形成主要涉及胚轴(embryonic axes)形成及其一系列相关的细胞分化过程。胚轴指胚胎的前－后轴(anterior－posterior axis)和背－腹轴(dorsal－ventral axis)。所有多细胞机体至少具有一种主要的胚轴，两侧对称的动物还具有中侧轴(mediolateral axis)或左－右轴(left－right axis)，由于这些轴之间互相垂直(图 8.1)，可作为形态描述的坐标。

胚轴的形成是在一系列基因多层次、网络性的调控下完成的。关于形体模式建立的机制，目前了解得最清楚的是果蝇，基本阐明果蝇胚轴形成的分子机制也是近十年来发育生物学取得的最大成就之一。关于两栖类胚轴形成分子机制的研究已积累了丰富的资料。本章以果蝇和两栖类为代表，介绍无脊椎动物和脊椎动物胚轴形成的机制。值得注意的是，图式形成涉及机体各个部分的发育，关于附肢和其他器官图式形成机制见其他有关章节。

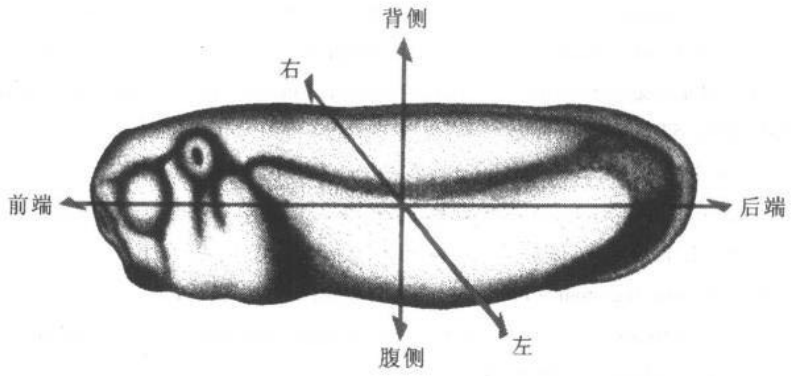


图 8.1　爪蟾尾芽期胚胎的前－后轴、背－腹轴和中侧轴，互呈垂直角度

第一节　果蝇胚轴形成

果蝇是遗传学背景了解得最清楚的真核生物之一。果蝇可以很容易地获得一系列突变体，而且果蝇幼虫体表的角皮(cuticle)又提供了很好的位置极性标志，利用果蝇突变体的表型对于胚轴形成相关基因比较容易进行鉴定。经过许多学者的努力，现已筛选到与胚胎前－后轴和背－腹轴形成有关的约 50 个母性影响基因和 120 个合子基因。通过对这些基因的研究，使我们对果蝇胚轴

形成的调控机制已有了一个较为清晰的认识。在果蝇最初的发育中，由母性影响基因构成位置信息的基本网络，激活合子基因的表达，控制果蝇形体模式建立。

一、果蝇胚胎的极性

果蝇的卵、胚胎、幼虫和成体都具有明确的前－后轴和背－腹轴。与其他两侧对称的动物相同，果蝇形体模式的形成是沿前－后轴和背－腹轴进行的。沿前－后轴果蝇胚胎和幼虫显示有规律的分节，由于这些分节属于3个解剖区，又可从前到后分为头节，3个胸节和8个腹节。在幼虫的两末端又特化为前面的原头和后端的尾节(图8.2)。在早期胚胎发育中，沿背－腹轴分化为4个区域，即背部外胚层、腹侧外胚层、中胚层和羊浆膜(图8.3)。

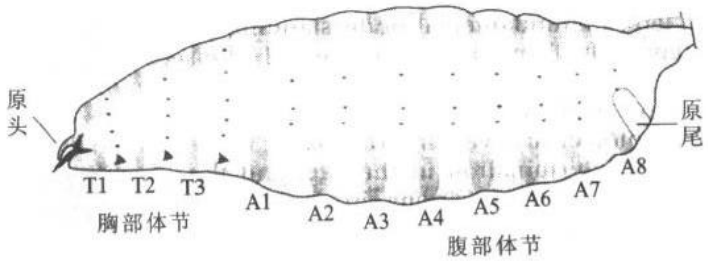


图8.2　果蝇1龄幼虫具有原头、原尾、3个胸节和8个腹节

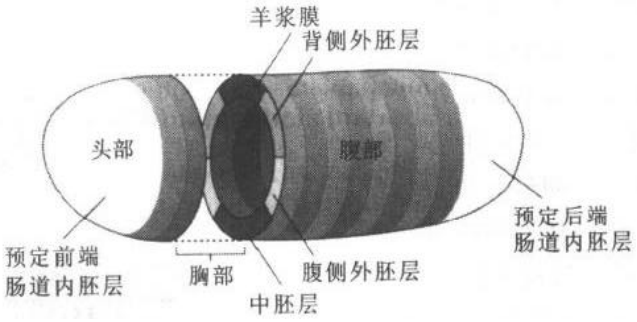


图8.3　果蝇沿前－后轴、背－腹和中侧轴建立形体模式

果蝇胚胎的极性是怎样产生的呢？早在20世纪初期，胚胎学家就注意到很多动物定位于受精卵中特定部位的细胞质与胚胎某些特定部位的发育有关。如果在果蝇卵的前极刺一小孔，使少量的细胞质流失，发育成的胚胎将缺失头部和胸部。这种情况与以后发现的 *bicoid* 基因突变体的表型非常相似。卵后极的极质流失时，胚胎最后端的尾节不受影响，而腹部却缺失。卵子其他部位细胞质的少量流失都不会影响形体模式形成。这说明卵子前、后极的细胞质中含有与果蝇图式形成有关的信息。

以后的研究发现，果蝇早期胚轴形成涉及一个由母性影响基因产物构成的位置信息网络。在这个网络中，一定浓度的特异性母源性RNA和蛋白质沿前－后轴和背－腹轴的不同区域分布，以激活胚胎基因组的程序。有4组母性影响基因与果蝇胚轴形成有关，其中3组与胚胎前－后轴的决定有关，即前端系统（anterior system）决定头胸部分节的区域，后端系统（posterior system）决定

分节的腹部，末端系统（terminal system）决定胚胎两端不分节的原头区和尾节，另一组基因决定胚胎的背－腹轴，即背腹系统（dorsoventral system）。在卵子发生中，这些母性影响基因的 mRNA 由滋养细胞合成后迁移进卵子，分别定位于一定区域。这些 mRNA 编码转录因子或翻译调控蛋白因子，它们在受精后立即翻译且分布于整个合胞体胚盘中，激活或抑制一些合子基因的表达，调控果蝇胚轴的形成。这些母性影响基因的蛋白质产物又称为形态发生素（morphogen）。

二、果蝇前－后轴的形成

1．果蝇前后极性的产生

果蝇胚胎、幼虫、成体的前后极性均来源于卵子的极性。对于调节胚胎前－后轴的形成有 4 个非常重要的形态发生素：BICOID（BCD）和 HUNCHBACK（HB）调节胚胎前端结构的形成，NANOS（NOS）和 CAUDAL（CDL）调节胚胎后端结构的形成。由形态发生素调节首先表达的合子基因，即缺口基因（gap gene）的表达。缺口基因表达区呈带状约相当于 3 个体节的宽度，表达区之间有部分重叠。不同浓度缺口基因的蛋白质产物引起成对控制基因（pair－rule gene）表达。虽然不同成对控制基因的表达图式不同，但均为与前－后轴垂直的 7 条表达带。成对控制基因的带状表达区将胚胎沿前－后轴划分成周期性的单位。成对控制基因蛋白质产物激活体节极性基因的转录，体节极性基因（segment polarity gene）的表达产物进一步将胚胎划分为 14 个体节。同时，缺口基因和成对控制基因的蛋白质产物，以及体节极性基因与同源异型基因（homeotic gene）之间的相互作用，调节同源异型基因的表达，而后者的表达产物则决定每个体节的发育命运（图 8.4）。

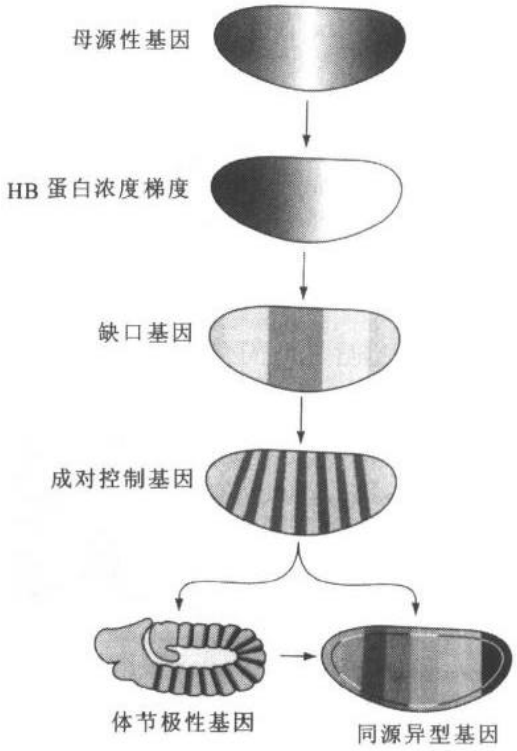


图 8.4 果蝇形体模式建立过程中沿前－后轴不同层次基因的表达

受精后，由定位于卵质中母性影响基因产物，如 *bcd* mRNA 立即翻译，激活 *hb* 基因表达，而 HB 可激活合子基因的表达。沿前－后轴依次激活 4 类主要的合子基因：缺口基因、成对控制基因、体节极性基因。缺口基因和成对控制基因可进一步激活同源异型基因。图中还显示每一类基因的表达的方式和主要功能

2．前端组织中心：BICOID（BCD）蛋白浓度梯度

前端系统至少包括 4 个主要基因，其中 *bicoid*（*bcd*）基因对于前端结构的决定起关键的作用。当 *bcd* 基因失活时胚胎的头部和胸部缺失，同时原头区被转化成尾节。如果向 *bcd* 基因突变胚胎的前端注射 *bcd* mRNA，可获得接近正常的胚胎；如果向胚胎其他位置注射 *bcd* mRNA，则可引起胚胎整个空间图式的显著改变，BCD 具有组织和决定胚胎极性与空间图式的功能。*bcd* 是一种母体效应基因，在卵子发生中 *bcd* mRNA在滋养细胞中转录并转运至卵细胞中，定位于卵子中预定胚胎的前极。*exuperantia*，*swal-*

low, *staufen* 基因与 *bcd* mRNA 的定位有关，同时 *bcd* mRNA 3′末端非翻译区中也含有与其定位有关的序列。受精后 *bcd* mRNA 迅速翻译，BCD 蛋白在前端积累并向后端弥散，形成从前向后稳定的浓度梯度（图 8.5，图 8.6），主要覆盖胚胎前 2/3 区域。

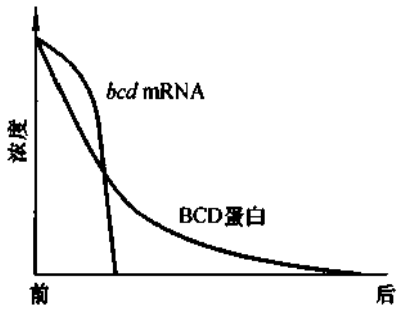


图 8.5　母体效应因子 BCD 和 *bcd* mRNA 沿果蝇前－后轴分布的浓度变化

bcd 基因是同源异型框基因，由其编码的 BCD 蛋白是一种转录调节因子，可以与 DNA 特异性结合并激活合子靶基因的表达。缺口基因 *hunchback*（*hb*）是其靶基因之一，是控制胚胎胸部及头部部分结构发育的重要基因。*hb* 在合胞体胚盘阶段开始翻译，表达区域主要位于胚胎前部（图8.6，图8.7），HB蛋白从前向后也形成一

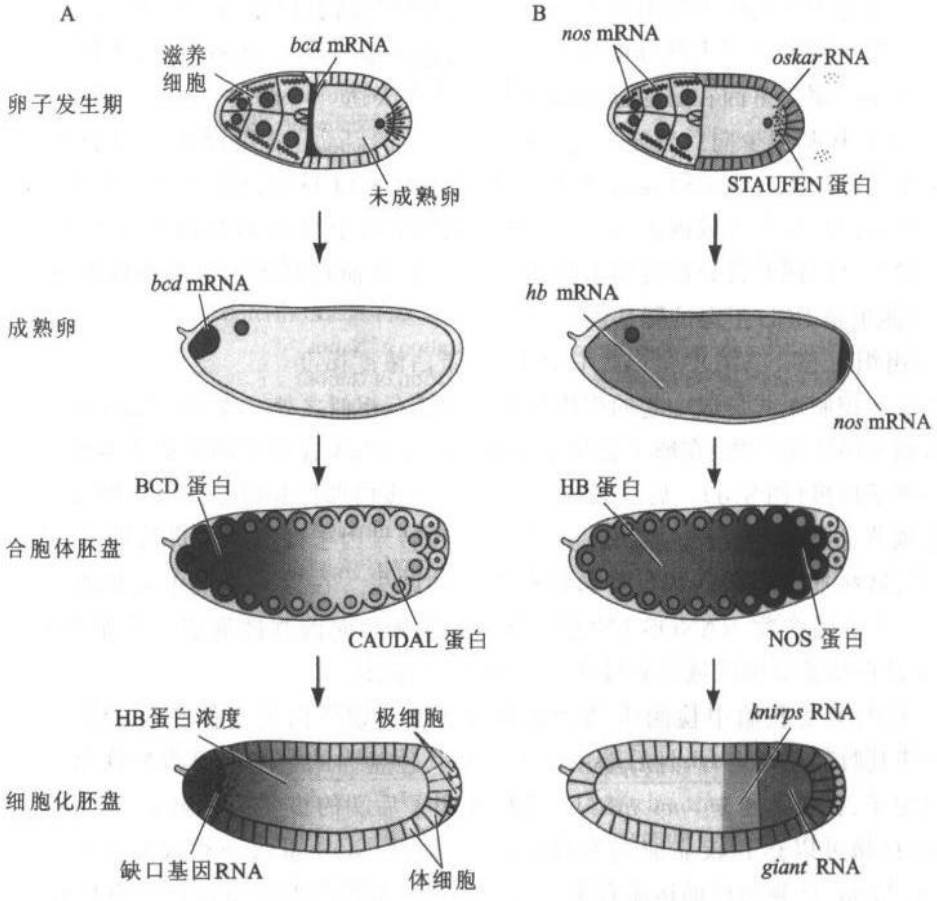


图 8.6　调控果蝇胚胎前后轴形成的两种系统

A. 在卵子发生中 *bcd* mRNA 在滋养细胞中转录并转运至卵细胞中，定位于卵子前极。受精后迅速翻译，BCD 蛋白在前端积累并向后端弥散，形成一种稳定的浓度梯度。该浓度梯度激活靶基因 *hb* 的表达，使 HB 蛋白形成从前向后的浓度梯度，控制胚胎胸部及头部结构的发育　B. *nos* mRNA 定位于卵子后极，其翻译产物 NOS 蛋白形成从后向前的浓度梯度调控靶基因 *knirps* 和 *giant* 的表达，进而控制胚胎腹部的发育

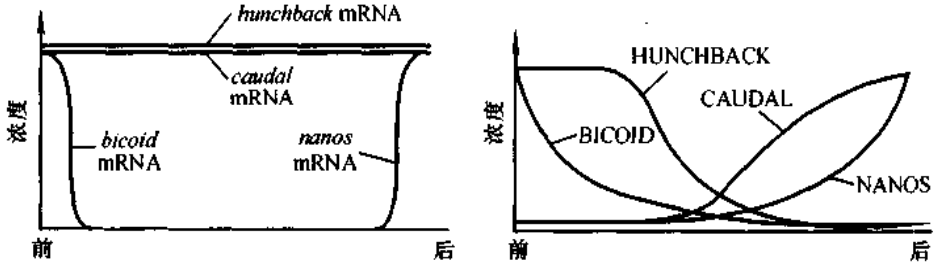


图 8.7 四种母体效应因子及其 mRNA 沿果蝇卵子和胚胎前－后轴分布的浓度变化示意图

种浓度梯度。当 *bcd* 基因突变时 *hb* 基因不表达;注射 *bcd* mRNA 使其含量增加时其表达区域向后延伸,*hb* 基因的表达区域也随着向后延伸。这说明 *hb* 基因的表达受到 BCD 蛋白浓度梯度的控制,只有 BCD 蛋白的浓度达到一定临界值才能启动 *hb* 基因的转录。*hb* 基因转录起始位点上游 300bp 的序列中含有 6 个 BCD 蛋白结合位点,其中 3 个强结合位点,3 个弱结合位点。启动子与 BCD 蛋白的结合能力对基因表达有重要影响。将 BCD 强结合位点与 lacZ 报告基因相连接,可指导 lacZ 报告基因在胚胎前部大部分区域表达,其表达区域与野生型 *hb* 基因类似,但 BCD 弱结合位点只能指导 lacZ 报告基因在胚胎前部较小的区域内表达。增加结合位点的数目可增加基因的表达水平,表达区域却很少向后延伸。这说明亲和力低的启动子需要高浓度 BCD 蛋白激活且只能指导该基因在前部较小的区域内表达,但只需要较低浓度 BCD 蛋白就可激活亲和力高的启动子,同时可指导该基因在较大区域内表达。不同靶基因的启动子与 BCD 蛋白具有不同的亲和力,BCD 蛋白的浓度梯度可以同时特异性启动不同基因的表达,从而将胚胎划分为不同的区域。*btd*, *ems* *otd* 基因很可能也是 BCD 蛋白的靶基因。

3. 后端组织中心:NANOS 蛋白和 CAUDAL 蛋白浓度梯度

后端系统在控制图式形成中起的作用与前端系统有相似之处。决定胚胎后端图式的最初信息也是母性影响基因转录产物,在卵子发生过程中,*nos* mRNA 在卵室前端的滋养细胞中转录,通过转运定位到卵子后极(图 8.6)。后端系统并不像 BCD 蛋白那样起指导性的作用,这些 mRNA 的产物不能直接调节合子基因的表达,而是通过抑制一种转录因子的翻译来进行调节。后端系统包括约 10 个基因,这些基因的突变都会导致胚胎腹部的缺失。在这一系统中起核心作用的是 *nanos* (*nos*) 基因。其编码产物 NANOS (NOS) 蛋白活性从后向前弥散形成一种浓度梯度(图 8.7)。NOS 的功能是在胚胎后端区域抑制母性 *hb* mRNA 的翻译。

在 *nos* 基因突变胚胎中检测不到后端极性活性。如果向突变体胚胎的腹部区域注射 *nos* mRNA则可使其腹部正常发育,且后端系统中所有其他基因的突变都可得到恢复。*nos* 基因编码一种后端决定子,在成熟卵中,*nos* mRNA 定位于卵子后端的极质中。由于 *nos* mRNA 定位于后端,而其功能区域可以达到较靠前端的腹部区域,因此 NOS 蛋白必须被运送到较靠前的区域。*pumilio* 基因与 *nos* 产物的向前运输有关。当 *pumilio* 基因突变时尽管极质中具有后端决定子活性,但胚胎腹部却不能完全形成。后端系统的其他基因与 *nos* mRNA 定位于后端有关,当这些基因突变时,*nos* mRNA 不能定位,极质不能形成,也不能形成极细胞。

缺口基因 *knirps* 和 *giant* 都是腹部图式建成所必需的基因。在合胞体胚盘阶段,这两个基因在相邻的区域内表达。而在后端系统的突变体中这两个基因均不表达,这说明其表达受到 NOS 的调控。但是,NOS 蛋白本身并不能直接调节合子缺口基因的表达,它是通过抑制母源性 *hb* mRNA

翻译成为转录抑制因子(transcription repressor)来实现的。*hb* 基因是在卵子发生过程中转录的母体效应基因，*hb* *m*RNA 在卵子中是均匀分布的，在卵裂阶段 HB 蛋白开始合成，分布在胚胎后部的 *hb* *m*RNA 的翻译被 NOS 的浓度梯度所抑制，而在前部 BCD 蛋白浓度梯度可以激活合子 *hb* 基因的表达。结果 HB 蛋白的分布区域主要只位于胚胎前半部分。

HB 蛋白含有 6 个锌指结构并可以与 DNA 结合，它可能直接抑制 *knirps* 和 *giant* 基因的表达，从而抑制腹部的形成。NOS 对 *hb* 基因表达的调控作用可能是在 RNA 水平进行的。在 *hb* 转录本的 3′非翻译区中有两个重复的短序列是 NOS 调控所必需的。给胚胎前端注射 *nos* *m*RNA 可抑制 *bcd* 基因的表达，而 *bcd* mRNA 3′端非翻译区中也含有一个与上述短序列类似的结构。这说明 NOS 对 *hb*，*bcd* 基因表达的抑制作用是在翻译水平上进行的，而母性 *hb* mRNA 在胚胎后端被降解可能也与此有关。

另一个重要的母源性产物 *caudal*(*cdl*)mRNA 最初也是均匀分布于整个卵质内，BCD 能抑制 *cdl* mRNA 的翻译。在 BCD 活性从前到后降低的浓度梯度作用下形成 CDL 蛋白从后到前降低的浓度梯度。*cdl* 基因的突变导致腹部体节发育不正常。

4. 末端系统：TORSO 信号途径

如果前端和后端系统都失活，果蝇胚胎仍可产生某些前后图式，形成具有两个尾节的胚胎。这说明还存在第三个与前－后轴确立有关的系统。末端系统包括约 9 个母体效应基因。这个系统基因的失活会导致胚胎不分节的部分缺失，即前端原头区和后端尾节缺失。

末端系统的作用方式与前两个系统完全不同。在这一系统中起关键作用的是 *torso*(*tor*)基因。*tor* 基因存在两类突变体：一类是失活突变体，胚胎缺失原头区和尾节；另一类是显性突变体，胚胎中部区域(头、胸、腹部)的分节缺失，而末端结构却增大。对 *tor* 基因的序列分析表明，这个基因编码一种跨膜酪氨酸激酶受体 (receptor tyrosine kinase, RTK)。TOR 蛋白在整个合胞体胚胎的表面表达(图 8.8)，其 NH_2－基端序列位于细胞膜外，COOH－基端位于膜内。当胚胎前、后末端细胞外存在某种信号分子(配体)时可使 TOR 特异性活化，最终导致胚胎前、后末端细胞命运的特化。向 *tor* 失活的胚胎末端注射野生型胚胎的胞质成分可使其恢复正常。RTK 的活化通常需要一种配体与其受体结合部位相结合。大量实验表明，*torso-like* (*tsl*) 基因可能编码这一配体。*tsl* 基因突变会产生与 *tor* 失活突变相似的表型。在卵子发生过程中，*tsl* 在两组特异性滤泡细胞中表达，即位于卵子前极的边缘细胞和卵室后端与卵子后极相对的极性滤泡细胞。TSL 蛋白被分泌到卵子两极处的围卵隙中，可能通过与卵黄膜的结合而维系在两极区域，直到 TOR 蛋白表达，TSL 才被释放。由于 TOR 蛋白过量，TSL 不会扩散到末端区以外，从而保证 *tor* 基因只在末端区被活化。在卵子发生过程中，*tsl* 基因的异位表达会引起胚胎末端区扩大，与 *tor* 显性突变的表型相似。除 TSL 外，末端途径

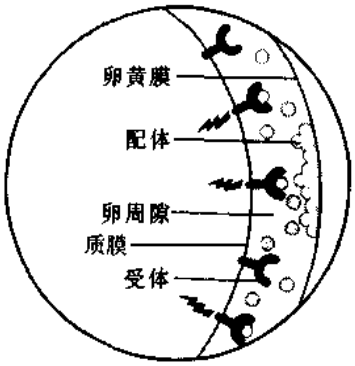


图 8.8　*tor* 基因对于控制果蝇胚胎末端的分化具有重要的作用

在卵子发生中，*tor* 基因编码的受体蛋白在整个卵子的质膜上表达，但其配体在卵子前、后的极性滤泡细胞中表达并通过与卵黄膜的结合而维持在两极区域。受精后配体被释放出来并穿过卵黄膜进入围卵隙。由于 TOR 蛋白的过量，从而保证 *tor* 基因只在末端区被活化

所需要的其他成分在胚胎中都是均匀分布的，*trk*，*fssDN*，*fssDph* 基因可能与调节 *tsl* 基因的表达、定位或活性有关。

TOR 与配体结合后，引起 TOR 蛋白分子自我磷酸化，经过一系列信号传递，最终激活合子靶基因的表达。*sos*，*draf*，*csw* 等基因在这一信号传递中起作用。这一途径可能首先活化某些转录因子，进而调节合子基因的表达。*tor* 基因的活化可激活合子缺口基因 *huckebein*（*hkb*）和 *tailless*（*tll*）在末端区的表达，这两个基因均编码转录调节因子。它们还可进一步调节其他基因的表达，其中也包括 *hb*，*ftz*，*kr* 基因等。

影响果蝇胚胎前后极性的母体效应基因总结如表 8.1。

表 8.1 影响果蝇胚胎前后极性的母体效应基因

基 因	突变表型	基因的功能与结构特征
1. 前端系统		
bicoid（*bcd*）	头和胸部缺失，代以倒置尾	前部形态发生素浓度梯度；含同源异型域；抑制尾部
exuperantia（*exu*）	前端头部结构缺失	锚定 *bicoid* mRNA
swallow（*swa*）	前端头部结构缺失	锚定 *bicoid* mRNA
2. 后端系统		
nanos（*nos*）	腹部缺失	后部形态发生素浓度梯度；抑制 HB 合成
tudor（*tud*）	腹部和极细胞缺失	NOS 定位
oskar（*osk*）	腹部和极细胞缺失	NOS 定位
vasa（*vas*）	腹部、极细胞和卵子发生缺失	NOS 定位
valois（*val*）	腹部、极细胞和细胞化发生缺失	NOS 定位复合物的稳定性维持
pumilio（*pum*）	腹部缺失	协助 NOS 与 *hb* mRNA 结合
caudal（*cdl*）	腹部缺失	激活后部末端系统基因
3. 末端系统		
torso（*tor*）	末端缺失	可能是末端形态发生素
trunk（*trk*）	末端缺失	为 TOR 传递 TOR 样信号
fs(1)*Nasrat*[*fs*(1)*N*]	末端缺失，卵子萎缩	为 TOR 传递 TOR 样信号
fs(1)*polehole*[*fs*(1)*ph*]	末端缺失，卵子萎缩	为 TOR 传递 TOR 样信号

三、果蝇背－腹轴的形成

1. 背腹系统

在果蝇与胚轴形成有关的 4 组母体效应基因中，背－腹系统最为复杂，涉及约 20 个基因。其中 *dorsal*（*dl*）等基因的突变会导致胚胎背部化，即产生具有背部结构而没有腹部结构的胚胎。与此相反，*cactus* 等基因的突变则引起胚胎腹部化，产生只具有腹部结构的胚胎。背－腹系统的作用方式与末端系统有相似之处，通过一种局部分布的信号分子，即定位于卵子腹侧卵黄膜上的配体激活分布于腹侧卵子膜上的受体，进而调节合子基因的表达。它对合子靶基因表达的调节方式则与前端系统相似，通过一种转录因子的浓度梯度来完成。但这种浓度梯度形成的方式却完全不同。*dl* 基因产物是这一信号传导途径的最后一个环节，它编码一种转录调节因子。*dl* mRNA 和 DL 蛋白在卵子中均匀分布。当胚胎发育到第 9 次细胞核分裂之后，细胞核迁移到达合胞体胚盘的外周皮质层，在胚胎腹侧 DL 蛋白开始往核内聚集，但在背侧 DL 蛋白仍位于胞质中，从而使 DL 蛋白在细胞核内的分布沿背－腹轴形成一种浓度梯度（图 8.9）。这一调控机制完全发生在 DL 蛋白向核中定位的过程中。DL 蛋白在细胞内的总浓度沿背－腹轴仍然是均一的，这在有丝分裂中 DL 蛋

白由核中释放时尤为清楚。*cactus* 基因与 DL 蛋白能否进入细胞核这一调控过程有关，当其编码产物 CACTUS 与 DL 蛋白结合时，DL 蛋白不能进入细胞核(图 8.10)。DL 蛋白的浓度梯度通过对下游靶基因的调控，控制沿背－腹轴产生区域特异性的位置信息。这种浓度梯度在腹侧组织中可活化合子基因 *twist*（*twi*）和 *snail*（*sna*）的表达，同时抑制 *dpp* 和 *zen* 基因的表达，进而指导腹部结构的发育。*dpp* 和 *zen* 基因在胚胎背侧表达，指导背部结构的发育。*zen* 基因启动子中的一个抑制因子含有 DL 结合位点，*twi* 基因上游序列同样含有 DL 结合位点，但是 DL 蛋白与 ZEN 抑制因子的结合能力比与 *twi* 上游序列的结合能力强得多，因此，*zen* 基因与 DL 蛋白亲和力高。在较低的 DL 浓度下 *zen* 基因表达被抑制，而 *twi* 基因的激活则需要较高浓度的 DL 蛋白。这说明 DL 蛋白浓度至少存在两个阈值，当核中没有 DL 蛋白时，*zen* 和 *dpp* 基因表达，当 DL 蛋白浓度达到第一个阈值时，*zen*，*dpp* 被抑制，而 *twi* 和 *sna* 不能被激活；当 DL 蛋白浓度达到第二个阈值时，*zen*，*dpp* 仍被抑制，*twi* 和 *sna* 则被激活。

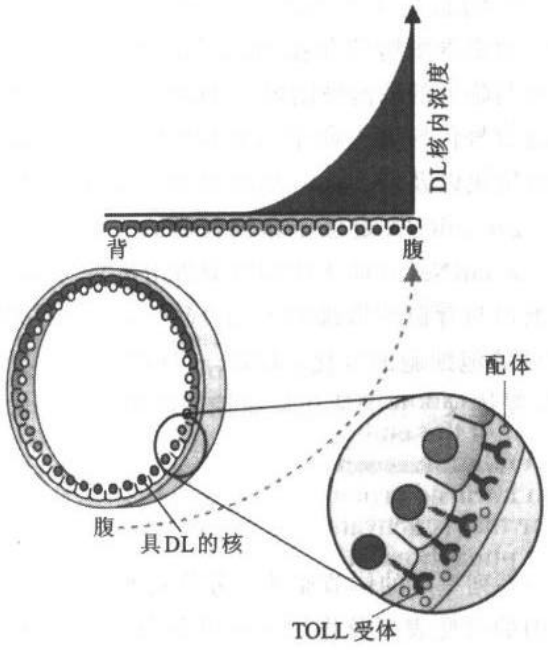


图 8.9　TOLL 激活的结果使 DL 蛋白在细胞核内的浓度沿背－腹轴形成浓度梯度

TOLL 是一种膜受体蛋白，仅在腹侧被受精后存在于卵周隙内的配体激活，通过信号传导激活 DL 蛋白进入附近的细胞核，形成 DL 蛋白在细胞核内从腹侧向背侧的浓度梯度

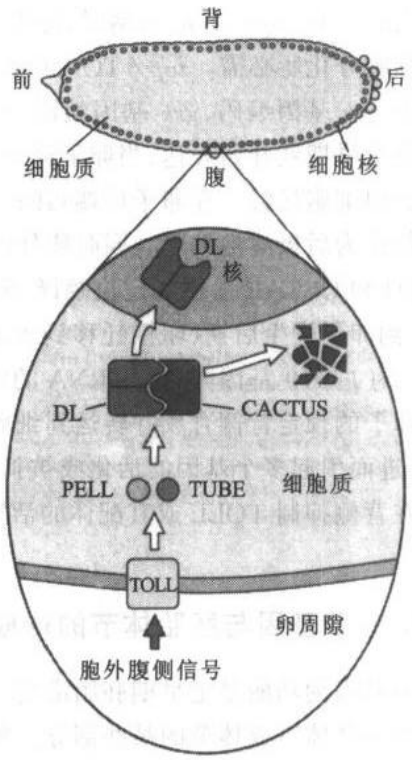


图 8.10　核 DL 蛋白定位的机制

未受精卵中 DL 存在于细胞质中与 CACTUS 蛋白结合，不能进入细胞核。当 TOLL 被细胞外信号激活时，通过细胞内信号传导，并涉及信号传导途径中其他母性影响基因产物的作用，最终使 CACTUS 蛋白降解，DL 蛋白释放而进入细胞核

toll 基因在这一系统中具有极其重要的作用。在合胞体胚盘阶段，TOLL 蛋白在整个细胞膜表面表达。*toll* 基因编码一种跨膜受体蛋白，与白介素－1 受体具有较高的同源性。TOLL 受体的配体分子也是母源性产物，是 *spätzle* 基因编码蛋白的裂解片断。这种蛋白质是由卵室腹侧的特异性滤泡细胞产生，在胚胎发育早期被释放后定位于卵周隙中，与 TOLL 受体蛋白结合并使之活化。

TOLL 激活后可激发一系列细胞内信号传导，并涉及信号传导途径中其他母体效应基因，如 *pelle*，*tube* 基因产物的作用，最终使 CACTUS 蛋白降解，DL 蛋白释放进而进入细胞核。此外，调节 DL 蛋白进入细胞核所涉及的基因还有 *pipe*，*nudel* 和 *windbentel*，它们在滤泡细胞中表达，很可能与 TOLL 配体的产生有关。

2. 滤泡细胞背腹极性的产生

在卵子发生过程中，滤泡细胞背腹极性的获得是由卵细胞的信号调控的。这个过程与 TOR 途径有相似之处，但是信号传递的方向却相反。这个信号传导途径至少包括 7 个基因，这些基因的突变会影响卵壳和卵的极性。*grk*，*top* 或 *cni* 的突变产生腹部化的胚胎，即胚胎腹部结构取代了背部结构；而 *fs(1)k10*，*sqd*，*spir* 或 *capu* 的失活则产生背部化的卵和胚胎。在这些基因中，*torpedo* (*top*)在体细胞来源的全部滤泡细胞中表达，其他基因则在生殖系细胞中表达。*top* 基因编码的蛋白质 TOP 是一种果蝇表皮生长因子受体同源物(*Dosophila* epidermal growth factor receptor homologue，DER)。在 *top*/ TOP 失活时，滤泡细胞和胚胎的发育均腹部化。说明这一受体的活性为背部滤泡细胞分化所必需。*top*/ TOP 的活性可能通过一种空间限制性信号来完成。有证据表明这一信号由 *grk* 基因编码，*grk* 基因编码一种 TGF－*α* 样蛋白，是 TOP 受体的一种配体。*grk* 基因在卵子发生早期就开始表达，当卵子移动到卵室后部，因滋养细胞的存在，前端与滤泡细胞分隔而后端与滤泡细胞接触。在卵子后端 GRK 蛋白合成，并与临近的滤泡细胞膜上 TOP 受体结合，使滤泡细胞特化为后极滤泡细胞。同时卵外的信号可通过信号传导进入卵子识别和作用于微管，而后者对 BCD 和 OSKAR 蛋白的定位翻译、卵子前后端的特化以及胚胎前－后轴形成有指导作用(图 8.11)。到卵子发生后期，卵核迁移到前端卵质中时，*grk* mRNA 定位于卵核背侧的一个“帽状区域”内。*fs(1)k10* 基因与 *grk* mRNA 的定位有关。*grk* mRNA 在卵子中的特异性分布使 GRK 蛋白仅在卵子的预定背侧合成并转运到细胞外，GRK 蛋白与背侧滤泡细胞上的 TOP 受体结合并使之活化，进而引起多个基因的活化或被抑制，决定背侧滤泡细胞的分化。GRK－TOP 信号途径可能通过在背侧抑制 TOLL 或其配体的活性，使 TOLL 受体仅在腹侧活化从而控制胚胎背－腹轴的形成。

四、分节基因与胚胎体节的形成

分节基因的功能是把早期胚胎沿前－后轴分为一系列重复的体节原基。分节基因的突变可使胚胎缺失某些体节或体节的某些部分。根据分节基因的突变表型及作用方式可分为三类：缺口基因、成对控制基因和体节极性基因，这三类基因的调控是逐级进行的。首先由母体效应基因控制缺口基因的活化，其次缺口基因之间互相调节彼此的转录且共同调节成对控制基因的表达，然后成对控制基因之间相互作用，把胚体分隔成为一系列重复的体节，并且进一步控制体节极性基因的表达。缺口基因和成对控制基因再共同调控同源异型基因的表达(参见图 8.4)。所以，胚盘末期的每一个体节原基都具有其独特基因表达的组合，从而决定每个体节的特征。

1. 缺口基因

缺口基因(gap gene)的表达区域为一些较宽的区域，每个区域的宽度约相当于 3 个体节，表达区之间可有部分重叠。当缺口基因突变时胚胎缺失相应的区域。缺口基因直接受母体效应基因的调控，例如缺口基因 *krüppel* 在胚胎中部第 4～6 副体节(parasegment)表达，该基因突变引起胚胎对应区域的缺失。副体节是指由胚胎的一系列中胚层加厚和外胚层沟分隔而形成的区域。由于外

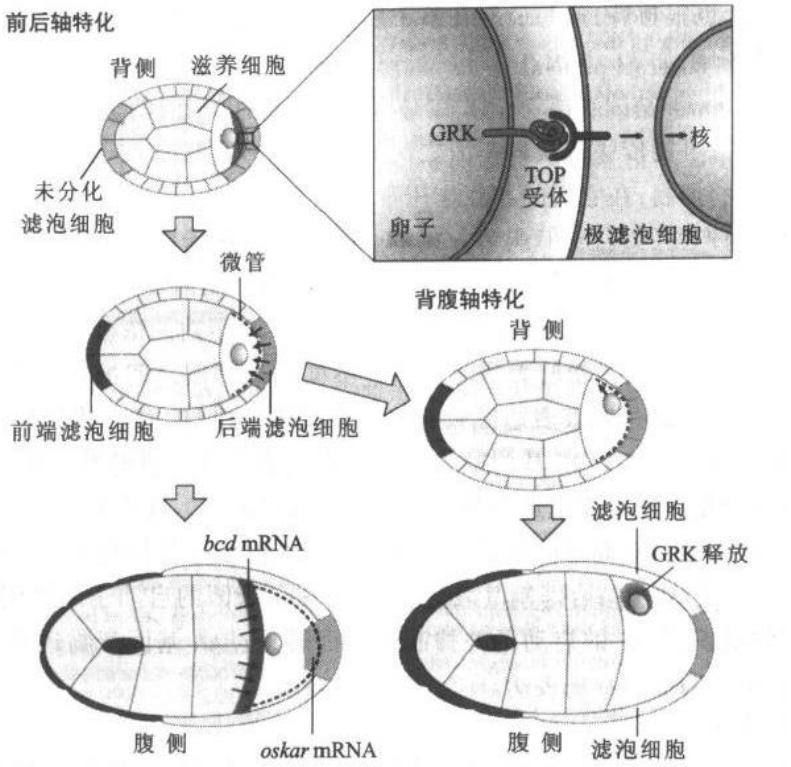


图 8.11　果蝇卵子发生中前后轴和背腹轴的特化机制

当卵子移动到卵室的后部，前端因滋养细胞的存在与滤泡细胞分隔，后端与滤泡细胞接触。卵子后端，GRK 翻译并与临近滤泡细胞膜上 TOP 受体结合，使滤泡细胞特化为后极滤泡细胞。同时，信号传导进入卵子，作用于微管，后者对 BCD 和 OSKAR 的定位和卵子前后轴的形成有指导作用。以后，核移到背侧同样指导背侧滤泡细胞特化

胚层沟将胚胎分为 14 个区域，这些区域通常与基因活性区域一致，但副体节与晚期胚胎、幼虫或成体的体节并不一致，每一副体节包含前一体节的后半部和后一体节的前半部(图 8.12)。副体节只能在原肠作用后一个短暂的时期内能观察到，由副体节到体节的分化有一个过渡时期。

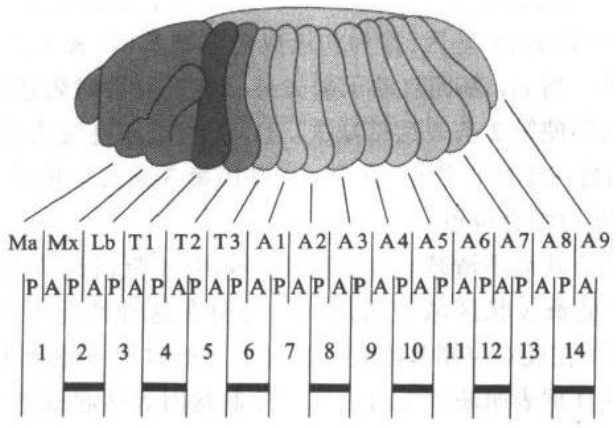


图 8.12　果蝇胚胎的体节与副体节

晚期胚胎和幼体的每个体节由前一副体节的后区和后一副体节的前区构成。图中 A 和 P 表示体节的前区和后区。Ma、Mx 和 Lb 为头部的 3 个体节，T1、T2、T3 为胸部体节，A1～A9 为腹部体节，1～14 为 14 个副体节。成对控制基因 *ftz* 的表达带的区域(黑色横线)正好与 7 个偶数副体节的位置一致

缺口基因的表达也很独特，通常最初在整个胚胎中都有较弱的表达，然后随着卵裂的进行逐渐变成一些不连续的区域，如 *hb* 基因在第 1～3、13 和 14 副体节前部表达，*kr* 基因在第 4～6 副体节的后部表达，*knirps*(*kni*) 基因在第 7～12 副体节表达。缺口基因的表达最初由母体效应基因启动，其表达图式的维持可能依赖于缺口基因之间的相互作用。例如 *hb* 基因的表达受 BCD 蛋白的激活而受 NOS 蛋白的抑制，在它们的相互作用下确定 *hb* 基因在胚胎前部的表达区域。*kr* 基因同样受到母体效应基因产物的调控，但调节方式不同，BCD、NOS 蛋白及 TOR 途径均可抑制 *kr* 基因表达。在 *bcd* 突变的胚胎中，*kr* 基因的表达区域一直达到胚胎前端，当 *bcd*、*nanos* 和 *torso* 均失活时，*kr* 基因在全部细胞中都表达。在胚胎中部 BCD 和 NOS 蛋白的浓度及 TOR 活性均很低，所以 *kr* 基因能够表达。这些基因最初的表达图式通过不同缺口基因之间的相互作用得到进一步的调节和稳定。如 *kr* 基因的表达在其表达区域的前端界线处受到 HB 蛋白的负调控，在后端界线则处受到 KNI 蛋白的负调控。如果 *kr* 基因缺失，*hb* 基因的表达则一直延续到原来 *kr* 基因的表达区域。这种边界性的抑制作用可能是这些基因产物间的直接作用。这些基因全部都编码转录调节因子，而且它们相互调节又具有高度的特异性。一种基因产物可以与其他多种基因的启动子结合，如 KR 蛋白既能与 *hb* 的启动子结合抑制其表达，又能与 *kni* 基因的启动子结合调节其转录。*tailless* 基因的蛋白质产物也识别 *kni* 的启动子并抑制该基因转录。*hb* 基因产物还可以识别自己的启动子，说明 HB 蛋白也可调节自身的表达。

2. 成对控制基因

成对控制基因(pair－rule gene)的表达区域以两个体节为单位且具有周期性，在相互间隔的一个副体节中表达。这些基因的功能是把缺口基因确定的区域进一步分成体节。当这类基因突变时相应的表达区域缺失。成对控制基因的表达是胚胎出现分节的最早标志。它们在细胞化胚盘期第 13 次核分裂时开始表达。表达图式非常独特，沿前－后轴形成一系列斑马纹状的条带，正好把胚胎分为预定体节。如 *ftz* 和 *eve* 基因在细胞化胚盘阶段的表达区域均为 7 条带，但它们的位置正好互补，所以 *ftz* 和 *eve* 基因共形成 14 条表达带。需要指出的是，并不是每个副体节的所有细胞都表达相同的成对控制基因，实际上，同一副体节中的每一排细胞都可能具有其独特的基因表达组合，这可能是由于缺口基因产物的特异性分布而导致的。有三个基因直接受到缺口基因的调控，即 *hairy*，*even－skipped*(*eve*)和 *runt* 基因，称为初级成对控制基因(表 8.2)。缺口基因可以识别初级成对控制基因的启动子。当 *eve* 基因启动子缺失某一特定片段时表达区域缺少第 7 条带，稍靠后一点启动子序列的缺失则使第 2 条表达带缺失。DNA 酶 I 印迹法表明第 2 条表达带形成区域包含 KR 蛋白和 HB 蛋白各三个结合位点，负责 *eve* 基因第 3 条带形成的区域则包含 20 个 HB 蛋白结合位点，但没有 KR 蛋白结合位点。

关于缺口基因的作用方式尚不清楚。当 HB，KR 和 KNI 蛋白都缺失时，成对控制基因 *hairy* 在整个胚胎中都表达，不呈条纹状区域表达图式。说明在这种情况下，带间区域原来被抑制的 *hairy* 基因被激活了。如果在成对控制基因表达图式形成的时期向胚胎注射蛋白质合成抑制剂也可获得类似的结果。这些证据表明缺口蛋白对成对控制基因表达起抑制作用，但也有实验表明缺口基因既可在一定的带区活化基因表达，又可同时抑制其他表达带区的形成。*hairy* 启动子中不同区域负责不同带区的形成。如果将分离纯化的 *hairy* 启动子区片段与 LacZ 报道基因连接，再导入果蝇缺口基因突变的胚胎中研究其表达，结果发现 KR 蛋白可活化第 5 条带的基因形成表达带但抑制第 6 条带形成，而 KNI 蛋白可活化第 6 条带的基因形成表达带而抑制第 7 条带的形成。第

6 条带的形成可能需要 KR 和 KNI 蛋白的相互作用，第 7 条带的形成则需要 TAILLESS 等蛋白的作用。

3. 体节极性基因

体节极性基因(segment polarity gene)在每一体节的特定区域细胞中表达。当这类基因突变时每个体节都缺失一个特定的区域。*engrailed*(*en*)和 *wingless*(*wg*)基因是最重要的体节极性基因。*en* 基因在每一副体节最前端的一列细胞中表达，*wg* 基因的表达区域刚好位于 *en* 基因表达带之前，即每一副体节的最后一列细胞。因此，这两个基因表达区域的界线正好确立副体节的界线。*en* 和 *wg* 因表达的启动受到成对控制基因 *eve* 和 *ftz* 等基因的调控。*eve* 和 *ftz* 等基因均含有同源异型基因框，都编码转录调节因子，这是调节 *en* 和 *wg* 基因表达的基础。*en* 基因在 FTZ 和 EVE 的浓度达到一定阈值之上时才能被激活，而 *wg* 基因的活化可低于这一阈值。但如果只有 EVE 和 FTZ 还不能启动 *en* 和 *wg* 基因的表达，在此过程中还需要成对控制基因 *paired*(*prd*)和 *odd paired*(*opa*)的作用。*prd* 基因最初的表达呈 7 条较宽的条带，但很快就变成 14 条窄的条带，正好与 *en* 和 *wg* 基因表达区域一致。虽然 *prd* 基因在每个副体节界线处均表达，但起作用的区域与 *eve* 的表达区域一致。所以在 *prd* 基因表达且 EVE 的浓度较高的区域 *en* 基因被激活；在 *prd* 基因表达且 EVE 和 FTZ 的浓度均较低的区域 *wg* 基因被激活。*opa* 基因可能与 *prd* 基因具有类似的表达图式，而其功能区域可能与 *prd* 互补。在 *opa* 表达和 FTZ 浓度高的区域激活 *en* 基因表达，而在 FTZ 浓度低的区域激活 *wg* 基因。在原肠作用开始时 *en* 和 *wg* 的表达已经开始，但在原肠作用过程中成对控制基因的表达量减少。它们表达的维持则依赖于对方的基因活性，*wg* 基因只在 *en* 基因表达区相邻的一列细胞中维持表达，而 *en* 基因在 *wg* 基因表达区之后的 1～2 列细胞中表达。当 *wg* 基因失活时，*en* 基因仍表达，但随着原肠作用的进行也逐渐衰退。在每个副体节边界处表达两种基因的细胞之间的相互作用是十分复杂的，大部分体节极性基因在这个过程中起作用。*wg* 基因编码一种分泌性蛋白，可能直接介导对 *en* 基因表达的维持。体节极性基因 *porc*，*dsh*，*zw3*，*arm* 等也都参与这一过程。*wg* 基因编码一种转录因子，*wg* 基因表达的维持由 *hedgehog*(*hh*)基因介导，*hh* 基因编码一种分泌性蛋白，表达区域与 *en* 基因一致。当 *hh* 基因突变时，*wg* 基因表达缺失，与 *en* 基因失活的情况相似。*ptc*，*fu*，*slp* 基因在 HH 蛋白调节 *wg* 基因表达的过程中起作用。其中 *ptc* 编码一种跨膜受体蛋白，它是 HH 蛋白功能的负调控因子，当 *ptc* 失活时，*wg* 基因表达范围扩大。

表 8.2　果蝇调控体节形成的主要基因

种　类	基　因
缺口基因	*Krüppel*(*kr*)，*Knirps*(*kni*)，*hunchback*(*hb*)，*giant*(*gt*)，*tailless*(*tll*)，*huckebein*(*btd*)，*buttonhead*(*btd*)，*empty spiracle*(*ems*)，*orthodenticle*(*otd*)
初级成对控制基因	*hairy*(*h*)，*even - skipped*(*eve*)，*runt*(*run*)
次级成对控制基因	*fushi tarazu*(*ftz*)，*odd - paired*(*opa*)，*odd - skipped*(*odd*)，*sloppy - paired*(*slp*)，*paired*(*prd*)
体节极性基因	*engrailed*(*en*)，*wingless*(*wg*)，*cubitus interruptus*(*ci*)，*hedgehog*(*hh*)，*fused*(*fu*)，*armadillo*(*arm*)，*patched*(*ptc*)，*pangolin*(*pan*)

果蝇胚胎早期发育中的副体节与晚期胚胎、幼体和成体中的体节间有一定的关系，但涉及的区域并不相同。由于成对控制基因在早期胚胎的每两个副体节中呈条纹状表达，如 *eve* 基因在奇数

副体节中表达。体节极性选择性基因 *en* 是在每个副体节的前部区域表达，可用以划定副体节前面的界限。晚期胚胎和幼体每个体节由前一副体节的后区和后一副体节的前区构成。也就是说，体节的位置对于早期发育中的副体节发生了偏移，副体节的前区变成了体节的后区，所以 *en* 在每个体节的后部表达。在以后的发育中体节进一步特化，分化产生具有特殊功能的附属物，如由特定体节发育成翅或肢等。除前端腹侧三个体节融合形成头部，其余体节形成胸部和腹部。

4．同源异型选择者基因(homeotic selector gene)

(1) 同源异型选择者基因的表达图式

在体节界限确立之后每个体节的结构被进一步特化，此过程由主调节基因(master regulatory gene)或称为同源异型选择者基因调控完成。果蝇大部分同源异型选择者基因都位于第 3 号染色体相邻的两个区域，其中一区域称为触角足复合体(antennapedia complex，Antp－C)，另一个区域是双胸复合体(bithorax complex ，BX－C)，这两个复合体统称同源异形复合体(homeotic gene complex，HOM－C)。HOM－C 是由 8 个基因构成的 2 个基因簇，如图 8.13 所示，从 3′末端到 5′末端依次为 *lab*，*pb*，*Dfd*，*Scr*，*Antp*，*Ubx*，*abdA* 和 *AbdB* 基因。还有一个同源异型选择者基因 *caudal* 在 HOM－C 区之外。果蝇的同源异型框基因 *bicoid*，*Zen*，*ftz* 虽然都位于 HOM－C 区内，但 *bicoid*，*Zen* 是母体效应基因，*ftz* 是分节基因，都不是同源异型选择者基因。

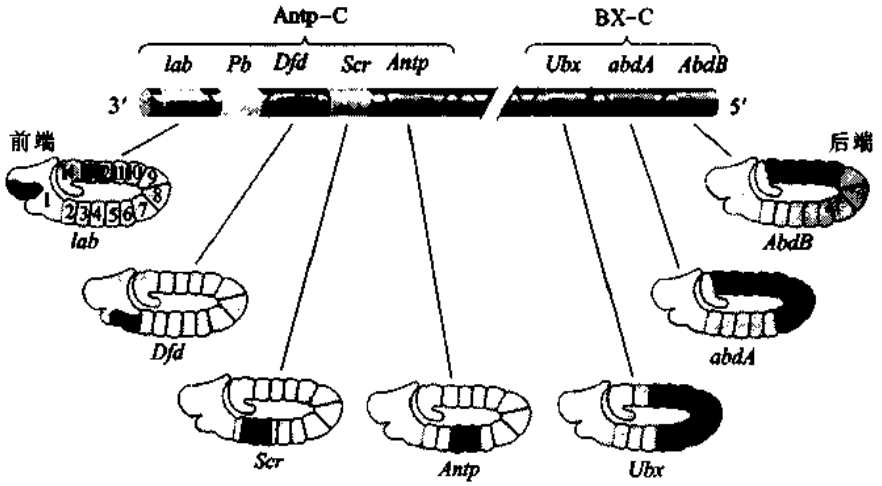


图 8.13 HOM－C 结构和表达示意图

在 Antp－C 中的 *lab* 和 *Dfd* 基因参与头部体节的特化，*Scr* 和 *Antp* 基因决定胸部体节的特征。*pb* 基因似乎只是在成体中起作用，但当它缺失时，口的下唇须被转化形成肢。BX－C 三个基因的功能为：*Ubx* 与胸部第三体节的分化相关，*abd－A* 和 *Abd－B* 负责腹部体节的分化。在 HOM－C 区之外的同源异型选择者基因 *caudal* 与尾节的发育有关。

同源异型选择者基因的突变可引起同源异形现象。例如 *Antp* 基因的显性突变体，因为该基因在头部和胸部同样表达而使头部的成虫盘被特化为胸部的成虫盘，所以头部长出了肢而不是触角；*Antp* 基因的隐性突变体由于 *Antp* 基因在第二胸节中不表达，结果第二胸节原来长肢的部位长出了触角。与此类似，当 *Ubx* 缺失时，原来以平衡器为结构特征的第三胸节转化为另一个第二胸节，形成具有 4 个翅的果蝇。同源异型选择者基因的异位表达也会引起同源异形转化现象。

这些主要的同源异型选择者基因已被克隆，并利用原位杂交分析了它们的表达图式。每个基因在胚胎的特定区域内表达，在中枢神经系统(CNS)中的表达特别强烈。除 *pb* 基因外，HOM－C 基因的表达图式与相应基因在染色体上的排列次序呈现一种线形关系，越靠近 3′末端的基因的表达区域也越靠近前端，而 5′末端的基因的表达区域则靠后端。

(2) 同源异型选择者基因表达图式的建立与维持

同源异型选择者基因表达图式的建立受成对控制基因和 gap 基因的调控。在 *ftz* 基因失活突变的胚胎中，*Scr*，*Antp* 和 *Ubx* 基因的转录水平比正常胚胎明显降低，且这三个基因最初的表达区域分别位于第 2、4、6 副体节，正好与 *ftz* 基因的第 1、2、3 条表达带相对应。与此相反，FTZ 蛋白对 *Dfd* 基因的转录具有负调控作用，在正常情况下，*ftz* 基因的前端表达带正好形成 *Dfd* 基因的后端表达区的界线。在 *ftz* 基因失活突变的胚胎中，*Dfd* 基因的后端表达界线向后延伸。另外还有一些成对控制基因，如 *eve*，*odd* 等也可以激活 *Dfd* 基因表达。但成对控制基因不能单独确立同源异型选择者基因的表达区域，否则同源异型选择者基因沿前－后轴也应该呈现出间隔性的表达图式。由于同源异型选择者基因通常在连续的体节中表达，gap 基因很可能在其表达界线的确立过程中起作用。*kr* 基因可活化 *Antp* 的表达而抑制 *Abd－B* 的转录，所以在胚胎中部区域高浓度的 KR 蛋白可增强 *Antp* 的转录而抑制 *Abd－B* 的表达。*knirps* 基因对 *Antp* 和 *Abd－B* 两个基因都有抑制作用。

果蝇的 HOM－C 基因在胚盘阶段被活化后，在大部分胚胎发育时期一直持续表达，这种表达的维持与其最初的启动可能无关，因为分节基因的表达是短暂的。HOM－C 基因表达的维持包括以下三种机制：第一种是自我调节机制。部分 HOM－C 基因的产物可以自动调节其本身的表达，如 *Dfd*，*Ubx* 基因的启动子中都包含有结合其自身产物的序列。第二种是相互调节机制。HOM－C 基因的表达区域多相互重叠，它们表达的精确调控可能需要这些基因的相互作用。一般认为，表达区域靠后的基因可部分和全部抑制表达区域靠前的基因，如 Bx－C 基因均可抑制 Anpt－C 基因的表达，ABD－A 蛋白可部分抑制 *Ubx* 基因的表达。第三种机制是正向和负向调控系统。HOM－C 基因的表达还具有复杂的正向和负向调控系统。POLYCOMB(PC)族蛋白和 TRITHORAX(TRX)族蛋白可稳定 HOM－C 基因的表达。*pc* 家族至少包括 11 个基因，其产物作为一组反式负调控因子调节 HOM－C 基因的表达。这些基因的突变可导致许多 HOM－C 基因的错误表达。PC 族蛋白可通过在适当区域抑制基因的表达而维持其表达界线。如 PC 蛋白可同时维持 *Antp*，*Ubx*，*abd－A* 和 *Abd－B* 的前端界线，这种蛋白沿前－后轴是均匀分布的。当 HOM－C 基因处于不活跃状态时，PC 蛋白可与染色质上 HOM－C 特异性区域结合，但在 HOM－C 基因处于活跃状态时，PC 蛋白则不能与之结合。PC 蛋白可能是通过改变染色质的结构而抑制基因表达。*trx* 基因编码一种正向调控因子，通过 RNA 不同剪切方式使其至少可以形成三种不同的产物。多种 HOM－C 基因的表达均需要 TRX 蛋白的作用。TRX 可以形成锌指样结构与 DNA 结合，TRX 蛋白对不同 HOM－C 基因的调控效应相当复杂，具有组织、副体节和启动子的特异性。此外，这种调节也需要其他因子的共同作用。

(3) HOM－C 基因的结构

为了更好地了解 HOM－C 基因的调节机理，必须了解 HOM－C 基因的结构特征。HOM－C 基因的结构是十分复杂的。有些基因具有多个启动子和多个转录启始位点。*Anpt* 基因有两种转录产物，其中一种在另一种转录本的一个内含子中启始转录。第一个启动子可被 KR 蛋白激活而

被 UBX 蛋白抑制，第二个启动子可被 HB 和 FTZ 蛋白激活而被 OSKAR 蛋白抑制。虽然从这两个启动子产生的蛋白质产物是相同的，由于存在两个启动子就可使 *Anpt* 基因在不同的细胞中表达。第一个启动子为背侧胸节的发育所必需，而第二个启动子为腹侧胸节(肢)的发育以及胚胎生存所必需。有的 HOM－C 基因可以通过不同的 RNA 剪切方式形成相关的一组蛋白质。此外，有的基因含有巨大的内含子，如 *Anpt* 基因的一个内含子长约 57 kb，比其所有外显子的总和还长 10 倍之多。这对于基因表达在时间上的调控可能具有重要意义。在果蝇胚胎发育中，一切过程都进行得很快，gap 基因、成对控制基因和 HOM－C 基因都表达，大约只需要 3 小时左右，估计在 25℃，果蝇基因转录的速率约为 1 000 核苷酸/min，所以长约 57 kb 的巨大内含子可使其蛋白质合成的时间推迟约 1 小时完成。

HOM－C 基因的另一个重要特征是都含有一段 180 bp 的保守序列，称为同源异型框(homeobox)。其他重要的发育调节基因，如 *bcd*，*ftz*，*eve* 也含有同源异型框。含有同源异型框的基因统称为同源异型框基因(homeobox gene)。由同源异型框编码的同源异型结构域(homeodomain)可形成与 DNA 特异性结合的螺旋－转角－螺旋结构。同源异型结构域对于决定整个蛋白质的调节专一性起重要作用。如果把 DFD 蛋白含有同源异型结构域的 66 个氨基酸用 UBX 蛋白的相应序列替代，结果嵌合蛋白不再具有 DFD 蛋白的调节功能，却可以调节 *Antp* 基因的转录，而 *Antp* 基因是 UBX 蛋白的靶基因之一。ANTP 与 SCR，ANTP 与 UBX 蛋白同源异型结构域的互换实验同样说明了同源异型结构域的重要性。现已发现同源异型框广泛地存在于真核生物调节基因中，许多动物，甚至在植物、真菌中都发现同源异型框基因。

综上所述，目前对果蝇胚胎早期发育机制已基本了解，胚胎的前－后轴和背－腹轴分别独立地由母体效应基因产物决定。这些母体效应基因主要编码转录因子，它们的产物通常形成一种浓度梯度并产生特异的位置信息，以进一步激活一系列合子基因的表达。随着这些基因的表达，胚胎被分成不同的区域。每个区域表达特异性基因的组合，沿前－后轴形成间隔性的图式，即体节的前体形式。此时每一条带的基因活性是由局部分布的蛋白质因子决定的。最后，每一体节通过 HOM－C 基因的特异性表达而确定其特征。但上述调控过程的许多细节问题还有待进一步研究。

应当指出的是，一方面果蝇的同一基因可能在各个不同发育过程中起作用。*wg* 基因对于果蝇幼虫外胚层的分化、中肠的图式形成、头部的发育、中枢神经系统部分神经元的发育等都具有重要的作用，而且成体的许多结构，如翅、肢、触角、眼等的发育也需要这个基因的作用。*runt* 基因不仅在分节过程，而且在神经分化、性别决定中起作用。*hh*，*en*，*toplder* 等也都是多功能基因。另一方面，越来越多的证据表明不同物种之间图式形成的机制有着惊人的相似性。果蝇图式形成机制的研究成果对于其他动物发育机制的研究具有非常重要的借鉴意义。果蝇的许多发育调节基因在脊椎动物中都找到了同源基因，并且许多同源基因在脊椎动物的发育过程中也起着类似作用。通常在脊椎动物中有多个基因与果蝇的一个基因同源构成基因家族，从而大大增加了其复杂性。

第二节 两栖类胚轴形成

近年来，对于脊椎动物胚轴形成的机制已逐渐有所了解，两栖类是调整型胚胎发育的典型模型，也是在胚轴形成机制方面了解较多的脊椎动物。脊椎动物胚轴的形成不仅与定位于囊胚期大

量分裂球中的各种决定因子相关，更重要的作用机制则存在于以后的发育阶段，发生在邻近细胞之间的一系列相互作用。两栖类胚胎的背－腹轴和前－后轴是由受精时卵质的重新分布而决定的。受精时由于精子入卵的影响，卵子皮质与卵黄在重力作用下相对移动，在精子入卵处的对面产生有色素差异的灰色新月区，由此标志预定胚胎的背侧。随着原肠胚的形成，精子进入的一侧发育成为胚胎的腹侧，相反的一侧发育为胚胎的背侧，在动物极附近的背侧形成头部，而与其相反的一侧形成尾，从而形成胚胎的背－腹轴和前－后轴。中侧轴或左－右轴是随着脊索的形成而确定。

一、组织者和 Nieuwkoop 中心

1. 组织者

如前所述，Spemann 利用发环对蝾螈受精卵的结扎实验证明，蝾螈早期卵裂球的细胞核具有产生一个完整蝾螈个体的潜能，但灰色新月区对于胚胎的正常发育是必需的。由灰色新月区产生的细胞形成胚孔背唇，随着背唇细胞的内陷开始原肠作用。两栖类进一步发育依赖于原肠作用的完成，在原肠作用过程中由于细胞重排，产生一系列邻近细胞之间的相互作用。Spemannm 和 Mangold 的蝾螈种间背唇移植实验进一步发现组织者细胞不仅具有自我分化能力，而且具有组织和诱导临近寄主细胞开始正常原肠作用的能力。两栖类原肠胚早期除来源于灰色新月区的胚孔背唇组织具有自主分化的能力外，其他组织发育的命运并未决定，但经过原肠作用到原肠胚晚期所有组织细胞发育的特殊命运均已被限定。在原肠作用中由组织者(organizer)诱导背部外胚层形成中枢神经系统的原基——神经管并作用于侧中胚层共同形成背－腹轴和前－后轴。

随着研究的深入已认识到尽管背唇细胞及其衍生物脊索和预定脊索中胚层还不能足以作为整个胚胎的诱导者，在以后各种器官原基形成和器官形成中都存在诱导作用，但由组织者启动了以后胚胎发育中的一系列诱导事件。组织者细胞在早期胚胎发育中具有重要的功能，概括起来主要有以下几个方面：① 组织者能够启动原肠作用；② 组织者细胞有能力发育成背部中胚层包括前脊索板，脊索中胚层等；③ 组织者能够诱导外胚层背部化形成神经板，并使后者发育为神经管；④ 组织者细胞能够诱导其周围的中胚层背部化(dorsalize)分化成为侧板中胚层而不是腹侧中胚层。爪蟾和其他脊椎动物胚胎前－后轴的形成在背－腹轴形成之后，胚胎的背部一旦建立随即开始中胚层细胞的内卷运动并建立前－后轴，最先经过胚孔背唇迁入的中胚层细胞产生前端结构，从侧唇和腹唇迁入的中胚层细胞形成后端结构。

2. Nieuwkoop 中心

在两栖类囊胚中最靠近背侧的一群植物半球细胞，对组织者具有特殊的诱导能力，称为 Nieuwkoop 中心(Nieuwkoop center)(图 8.14)。Nieuwkoop 中心是由于精子入卵使卵质在重力作用下旋转而产生的兼具动物极和植物极细胞质的特殊区域。该区域含有背部中胚层诱导信号，如果用紫外线照射的方法抑制卵质的旋转，胚胎将缺乏头和神经管等前端背部结构。但如果在 32 细胞期移植正常胚胎最靠近背侧的植物半球细胞可修复其缺陷。所以两栖类背－腹轴的形成从

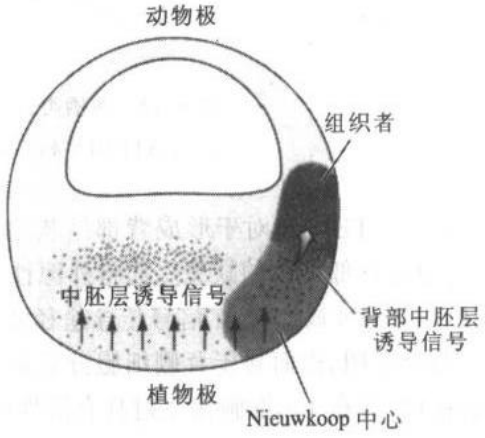


图 8.14　爪蟾组织者和 Nieuwkoop 中心及中胚层诱导模型

精子入卵时就已经开始。Nieuwkoop 等的一系列实验为胚孔背唇细胞具有组织者的作用机制提供了重要的线索，表明原肠作用新形成的中胚层是由其下方的植物半球预定内胚层细胞对动物半球外胚层诱导的结果。由植物半球内胚层细胞的背－腹极性决定动物半球细胞分化方向是背部中胚层还是腹部中胚层。由靠近精子进入点附近腹面的植物半球细胞诱导腹侧中胚层产生间质和血细胞等，而由精子进入点侧面植物半球细胞诱导中胚层中部细胞产生肌肉、肾等，由最背侧植物半球细胞诱导包括组织者在内的背中胚层分化成为脊索和体节。

二、两栖类胚轴形成的机制

1. Nieuwkoop 中心的分子生物学研究

关于 Nieuwkoop 中心的深入研究发现，爪蟾的内胚层细胞通过引起预定中胚层细胞表达 *Xenopus Brachyury*(*Xbra*)基因，进而诱导中胚层的形成。至于其诱导的机制还不清楚，但已知 *Xbra* 基因编码的蛋白质是个转录因子，可以激活编码中胚层特异性蛋白质的一些基因。所有植物半球的细胞都有能力诱导动物半球边缘带细胞分化成为中胚层，但只有最靠近背侧的植物半球细胞，能指令位于其上方背部边缘带细胞分化成为组织者。这些最靠近背侧的植物半球细胞，由于表达一些特殊的细胞因子而形成 Nieuwkoop 中心。β－CATENIN 是 Nieuwkoop 中心的一个主要细胞因子。*β－catenin* 是一种母体效应基因，其编码的蛋白质 β－CATENIN 是一种多功能蛋白，既能锚定细胞膜上的钙粘蛋白又是个核内转录因子。在爪蟾胚胎发育中 β－CATENIN 在预定胚胎背部的积累最初开始于受精时卵质的旋转移动过程。在整个早期卵裂阶段 β－CATENIN 继续积累，主要位置仍然在胚胎背部(图 8.15)，同时在背部细胞的核仁中也能检测到 β－CATENIN。最初积累的区域包括 Nieuwkoop 中心和组织者区，但是到卵裂晚期只有 Nieuwkoop 中心的细胞具有 β－CATENIN。

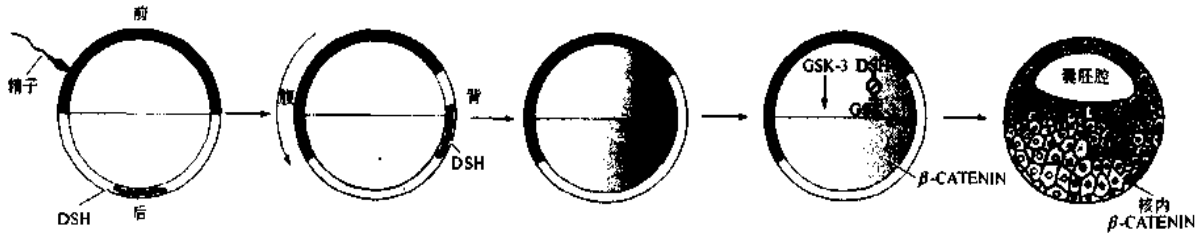


图 8.15 两栖类背－腹轴的形成从精子入卵时开始，DSH，β－CATENIN 和 GSK－3 在背－腹轴形成中具有重要作用

β－CATENIN 对于形成背部结构是必需的。如用反义寡核苷酸消耗 β－*catenin* 的转录产物，将引起背部结构的缺失。而将外源性 β－catenin 注射进正常胚胎的腹侧可诱导次生胚轴产生。β－CATENIN 属于 Wnt 信号传导途径的一个分子。糖原合成激酶－3(GSK－3)对 β－CATENIN 有负调控作用，进而对于背侧细胞分化起抑制作用。GSK－3 同样在胚轴的形成中起着非常关键性的作用，若在 1－细胞期注射具有活性的 GSK－3，以后胚轴的发育将受到抑制，若在早期胚胎发育阶段用具有极强负作用的蛋白质抑制腹侧细胞 GSK－3 的活性则引起次生胚轴形成。β－CATENIN 开始在整个胚胎中均有分布，但在腹侧细胞中因为 GSK－3 介导的磷酸化作用而特异

性降解，而在背侧细胞中由于存在 GSK－3 的抑制子 Disheveled（DSH）蛋白，所以 β－CATENIN 不会被降解。DSH 蛋白开始存在于爪蟾未受精卵植物半球的皮质部，在受精时 DSH 蛋白沿微管束迁移到胚胎的背侧起作用。由于 β－CATENIN 是转录因子，它也可以与其他转录因子结合并赋予后者新的特性。如爪蟾 β－CATENIN 与一种普遍存在的转录因子 TCF3 结合，形成的 β－CATENIN/TCF3 复合物能够与对胚轴形成具有重要作用的其他几个基因的启动子结合并激活它们的转录。被激活的基因中也包括 *siamois*（*sms*）基因，该基因于囊胚中期转换后立即在 Nieuwkoop 中心表达。TCF3 是 *sms* 基因转录的抑制因子，但当 β－CATENIN/TCF3 复合物与 *sms* 基因的启动子结合时可使 *sms* 基因激活。*sms* 基因编码的蛋白 SIAMOIS（SMS）对组织者特异性基因的表达起着关键性的作用。SMS 能与 *goosecoid*（*gcd*）基因的启动子结合并激活该基因表达，其蛋白质产物 GOOSECOID(GCD)又为组织者许多基因的激活所必需。存在于组织者细胞中的 *gcd* 基因是 Nieuwkoop 中心分泌蛋白因子作用的主要靶基因之一。*gcd* mRNA 表达的区域与组织者的范围有关。如果用氯化锂处理原肠期以前的胚胎可引起组织者中胚层的范围扩大到整个边缘带，*gcd* 基因的表达区域也同样被扩大。与此相反，如果在第一次卵裂前用紫外线照射使胚胎发育缺乏背部和前端的诱导，*gcd* 基因的表达也受到抑制。移植实验进一步表明注射标记 *gcd* 基因的供体细胞能够支配临近寄主细胞形成背轴。GCD 是一种 DNA 结合蛋白，具有激活胚孔背唇细胞迁移的属性，能够激活控制脑形成的关键基因 *Xotx*2，使后者在前端中胚层和预定脑外胚层中表达。

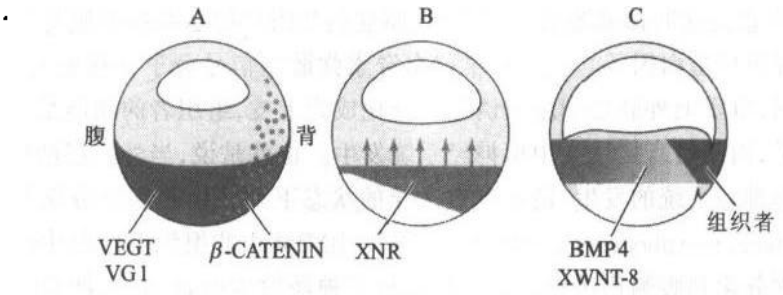


图 8.16　β－CATENIN 和 TGF－β 蛋白等相互作用形成组织者和诱导中胚层产生

除 SMS 的作用之外，*gcd* 基因的激活也同时受到定位于植物半球和 Nieuwkoop 中心的 TGF－β 基因家族蛋白产物的协同作用（图 8.16）。这里所涉及的 TGF－β 蛋白质因子是 Vg1，VegT 和 Nodal－相关基因编码蛋白。这些蛋白质由内胚层合成，近来有证据表明这些蛋白质可能以同样途径起作用。它们中最重要的是 Nodal－相关蛋白，在囊胚晚期有三种 Nodal－相关蛋白：XNR1，XNR2 和 XNR4，在内胚层中 Nodal－相关基因的表达从背侧到腹侧呈一定的浓度梯度分布。这种浓度梯度是由于定位于背侧的 β－CATENIN 与定位于植物极的 VG1，VEGT 信号相互作用的结果。Nodal－相关蛋白的浓度梯度使中胚层细胞分化，含有大量 Nodal－相关蛋白的中胚层细胞分化成为组织者，含有较少 Nodal－相关蛋白的中胚层细胞成为侧板中胚层，不含 Nodal－相关蛋白或含量极低的中胚层细胞分化成腹侧中胚层。

综上所述，为维持正常的发育在胚胎背部细胞中必须含有 β－CATENIN，并使 *sms* 基因表达，SMS 与 TGF－β 基因家族的蛋白产物协同作用使 *gcd* 基因激活，在 SMS 和 GCD 等共同作用才能

形成组织者。组织者的形成涉及多种基因的激活，存在于 Nieuwkoop 中心的分泌蛋白激活位于其上方中胚层细胞中一系列转录因子，后者再激活编码组织者分泌产物的一些基因。目前已经发现多种组织者特异性转录因子和分泌性蛋白因子。主要的核蛋白是 XLIM1，XNOT，OTX2，XFD1，XANF1，GCD 和 HNF3－β 相关蛋白。主要的分泌性蛋白因子是 CHORDIN(CHD)，DICKKOPF(DCK)，NOGGIN(NGN)，FOLLISTATIN(FST)，ADMP，FRZB，ONIC，HEDGEHOG(HH)，CERBERUS 和 Nodal－相关蛋白。在各种蛋白因子协同作用下胚胎发育才能正常进行(图 8.17)。

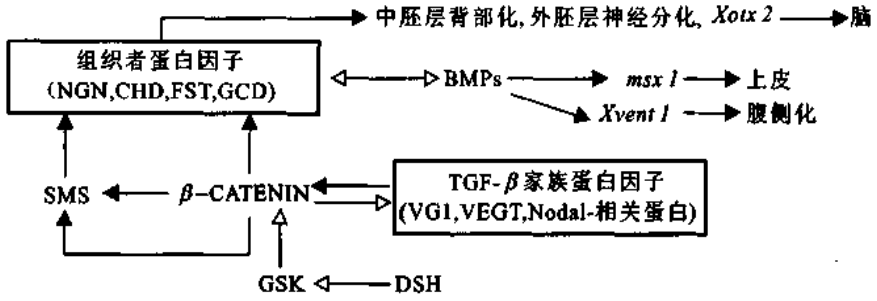


图 8.17 两栖类胚胎背－腹轴形成主要相关蛋白因子作用示意图
实心箭头示正调控，空心箭头示负调控

2．第一类组织者分泌性蛋白因子和 BMP 抑制因子

GCD 在细胞核中直接或间接地激活一些基因，而这些基因产物是调控细胞进行背－腹轴和前－后轴分化功能的可溶性蛋白因子。虽然很早就有脊索弥散型信号分子存在的实验证据，但是直到最近人们才认识到，事实上外胚层细胞被诱导后分化成为上皮，组织者的功能是分泌抑制诱导作用的可溶性蛋白因子，而不是直接诱导中枢神经系统发生。也就是说，当外胚层细胞在未被诱导的情况下才能进行中枢神经系统的发生，而在有效诱导的状态下外胚层细胞将分化为上皮。其诱导因子是骨形成蛋白(bone morphogenetic protein，BMP)。BMP4 由非组织者区的中胚层细胞合成和分泌是最重要的上皮分化和腹侧化诱导因子。但是对于神经发生而言，它是抑制因子或抗神经化因子，其功能与组织者的作用正好相反(图 8.18A)。当 BMP4 与外胚层细胞接触时激活 *msx1* 等基因表达，后者进而激活上皮特异性基因表达，同时抑制产生神经表型的基因。在中胚层中，BMP4 激活 *Xvent1* 等基因，这些基因的表达使中胚层显示腹侧表型。注射了一定量 BMP4 mRNA 的爪蟾受精卵发育成仅有腹中胚层和侧中胚层的胚胎。如果使对于 BMP4 有明显抑制作用的受体过表达则可诱导胚胎形成两个背轴。另外，进行神经发生的外胚层和组织者能分泌一些可溶性蛋白因子阻滞 BMP 的作用。已知 NGN、CHD、Nodal－相关蛋白－3 和 FST 均能防止 BMP 与靠近组织者的外胚层和中胚层接触。NGN 是首先从组织者分离的一种可溶性蛋白因子。*ngn* mRNA 首先出现在胚孔背唇区域，以后在脊索组织中表达。向 1 细胞期胚胎注射 *ngn* mRNA 可以弥补紫外线照射对胚胎的损伤，进行正常背轴分化和发育成完整的胚胎。NGN 是分泌蛋白，能够完成组织者的两种主要的功能，即诱导背部外胚层形成神经组织和使中胚层细胞背部化。NGN 能与 BMP2 和 BMP4 结合，可抑制它们与受体的结合。另一个组织者蛋白是 CHD，其 mRNA 最初也定位于胚孔背唇区域，以后在脊索和背中胚层组织中表达。与 NGN 相同，CHD 能与 BMP2 和 BMP4 直接结合，抑制它们与受体形成复合物。此外，Nodal－相关蛋白－3(XNR－3)由组织者表面的细

胞合成，对 BMP4 也有抑制作用。第四个组织者分泌蛋白是 FST，它能结合和抑制辅肌动蛋白(ACTIVIN)和其他相关蛋白。利用原位杂交的方法可显示 *fst* mRNA 在胚孔背唇和脊索组织中表达。

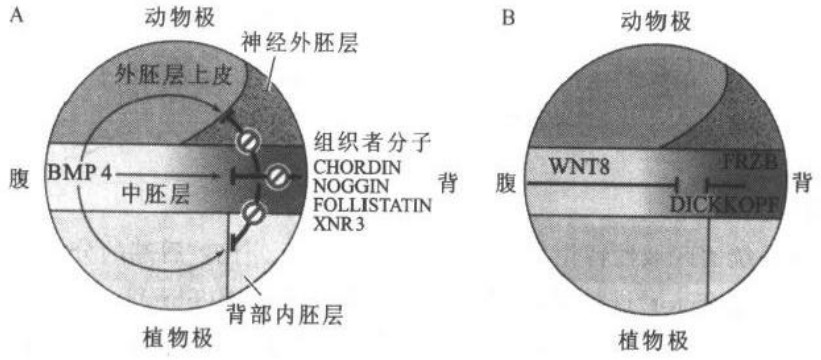


图 8.18　组织者作用模型

A. 第一类组织者分泌性蛋白因子和 BMP 等抑制因子　B. 第二类组织者分泌性蛋白因子和 WNT 抑制因子

3. 第二类组织者分泌性蛋白因子和 WNT 抑制因子

已知中枢神经组织由组织者诱导产生，脊索的最前端组织相当于组织者，但是在头和脑的最前端下方并没有脊索组织，而是咽鳃区内胚层和头部中胚层，由这种内－中胚层组织构成胚孔背唇的前缘。近年来的研究表明，这些细胞不仅能诱导最前端的头部结构，而且能够阻滞 WNT 信号传导途径。生长分化因子 WNT 家族的成员之一，WNT8 能够抑制神经诱导。WNT8 由除背唇区以外的所有边缘带中胚层细胞合成，与 BMP4 的功能类似是由非组织者中胚层分泌的另一个抗神经化蛋白因子(anti-neuralizing protein)。在组织者中存在阻滞 WNT8 功能的一些蛋白因子(图 8.18B)。Bouwmeester 等(1996)首先发现组织者的一种分泌蛋白，CERBERUS(CBR)能够完成对最前端头部结构形成的诱导。CBR 既能与 BMPs 结合，又能与 WNT8 结合。以后 Glinka 等(1997)和 Piccolo 等(1999)已进一步证明 *cerberus*(*cbr*)基因表达于咽鳃区内胚层细胞，这些细胞起源于早期发育中背唇深层的细胞。在 CBR 蛋白的功能被报道后不久又发现另外两个蛋白因子 FRZB 和 DICKKOPF(DCK)，它们由原肠作用中内卷的内－中胚层细胞合成。FRZB 是个相对分子质量较小的可溶性蛋白，也是 WNT 的受体。如果使胚胎超表达 *frzb* 基因，WNT 信号传导途径就不能发生，胚胎将只有发育的头部而缺乏腹侧和后部结构。DCK 蛋白与 FRZB 有类似的功能也能够与 WNT 蛋白结合。

在外胚层中控制神经分化表型的关键蛋白是 NEUROGENIN(NRG)。*Neurogenin*(*nrg*)基因表达与否决定于外胚层中是否有 BMP 信号。当 BMP 信号缺乏时，转录因子可引起 *nrg* 基因表达；当外胚层中存在 BMP 信号时，由 BMP 诱导产生的转录因子如 MSX1 等抑制 *nrg* 基因表达。NRG 本身也是个转录因子，能够激活一系列编码控制神经特异性蛋白的基因。同时 NGN 和 CBRS 诱导外胚层中另一个转录因子，爪蟾脑因子－2(XBF－2)产生，后者可抑制上皮分化相关基因的表达。在各种正负调节因子的共同调控下，背部外胚层可避免向上皮方向分化而转入神经板组织的分化和发育成神经管(图 8.19)。进一步发生神经结构的区域性特化形成前脑、后脑和脊髓的过程中，同样依赖于前述组织者分泌蛋白因子的诱导。

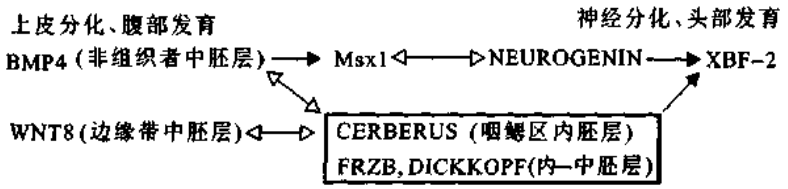


图 8.19 两栖类胚胎中阻滞 WNT8 和 BMP4 功能的一些蛋白因子示意图
实心箭头示正调控；空心箭头示负调控

4. 后端化因子

随着前端神经系统的区域性特化神经管，后端开始进行分化。后端的分化由胚胎后端产生后端化因子（posteriorizing factor）进行调控，成纤维母细胞生长因子（fibroblast growth factors，eFGF），WNT3a 和视黄酸（Retinoic acid，RA）都是后端化因子。eFGF 可能由后端脊索诱导产生，在爪蟾胚胎后端和尾芽中胚层表达。在体外实验体系中 eFGF 可使前端神经组织转变为后端神经组织。eFGF的过表达可以上调几种后端化相关基因，如爪蟾 *caudal* 的同源基因等的表达。这些基因的编码蛋白调节 Hox 基因的表达，与果蝇形体模式建成的情况类似，Hox 基因在调节沿前－后轴分布的体节分化中有重要作用。在后端导致尾部神经系统出现更多后端化特征。RA 在神经管的后端化过程中也发挥作用，如用微量 RA 处理爪蟾神经胚，前脑和中脑的发育能力将被削弱。RA 对中胚层和外胚层细胞的分化都有一定影响：用来源于 RA 处理的原肠胚背中胚层前端组织进行移植，不能诱导寄主胚胎产生头部结构，用 RA 处理的外胚层也不能对正常原肠胚前端中胚层的诱导作用发生应答。RA 能激活靠后端的 Hox 基因表达。*Xwnt3a* 基因在早神经胚的神经外胚层中表达，WNT3a 是爪蟾的一个尾端化因子（caudalizing factor）。如果给爪蟾胚胎注射 *Xwnt3a* mRNA 使 WNT3a 过表达，将发育成为没有前端特征的胚胎。后端化的这三种因子既可以在胚胎的不同区域发挥不同的作用，又可以协同作用。RA 主要作用于后脑的图式形成，eFGF 对于脊髓的分区最为重要，WNT3a 不仅抑制前端控制基因的表达，对于其他两种蛋白质的功能有协同作用。

5. 中侧轴特化因子

蝌蚪不仅外形是两侧对称的，内脏器官的分布也左右平衡，所以除背－腹轴和前－后轴之外，两栖类胚胎还存在中侧轴。目前已研究过的脊椎动物中侧轴形成的关键事件都是由原肠胚左侧侧板中胚层中表达的 *nodal*－相关基因调控。爪蟾的 *nodal*－相关基因－1（*Xnr－1*）在正常胚胎的右侧、心脏后部和随意卷曲的肠道组织中均不表达，其表达区域仅局限于原肠胚左侧。至于产生的原因，可能主要与受精时卵质旋转中所涉及的微管运动相关，但具体机制不明。如果抑制这些微管运动，将形成无中侧轴的胚胎。此外，在整个植物半球存在的 VG1 蛋白可以增加胚胎左－右对称的特化。如果将具有活性的 VG1 蛋白注射进植物半球左侧，对以后的发育没有影响，但如果将其注射进右侧植物半球，则可诱导 *Xnr－1* 的表达区域扩大到右侧侧板中胚层，引起心脏和肠的位置紊乱。特别是把具有活性的 VG1 蛋白注射进背中线右侧第三个植物半球的细胞中，可引起胚胎整个左－右逆转。目前对 *Xnr－1* 的作用机制尚不能完全阐明，但已知 XNR－1 激活一个很重要的基因，*pitx2* 在胚胎左侧的专一性表达，进而调控心脏和肠的发育按照正常位置进行，调控胚体的两侧对称和中侧轴的形成。

随着胚胎的背－腹轴、前－后轴和中侧轴逐渐形成，产生体节分化和由三个胚层细胞构成的各

种组织和器官原基，两栖类胚体模式逐渐建成。

所有脊椎动物的个体发育都经历相似的早期发育阶段，在胚胎发育早期都要经历原肠作用，产生代表脊椎动物胚胎背－腹极性和前－后极性的主要结构特征：脊索、神经管和体节、逐渐建立各种动物的胚体模式。尽管蛙、斑马鱼、鸡和小鼠体轴形成的机制存在差异，但是不同物种之间胚体图式形成的机制却具有惊人的相似性，在此发育过程中都涉及母体效应基因的产物——母体效应决定子的定位、外源信号的影响和细胞间的相互作用，涉及一系列信号传导分子的作用。目前已发现的信号传导分子主要属于 FGF、TGF、Hedgehog、Wingless 等基因家族，有关这些信号传导机制的研究是目前最活跃的领域之一。

参考文献

1 Agius E M, *et al*. Endodermal Nodal－related signals and mesoderm induction in *Xenopus*. Development ,2000,127: 1151～1159

2 Belvin M P, Anderson K V. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* Toll－dorsal pathway. Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.,1996, 12: 393～416

3 Bouwmeester T, *et al*. Cerberus is a head－inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. Nature, 1996,382:595～601

4 Cho K W Y, *et al*. Molecular nature of Spemann's organizer: The role of the *Xenopus* homeobox gene goosecoid. Cell 1991,67: 1 111～1120

5 Driever W, Nüsslein－Volhard C. The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration dependent manner. Cell,1998, 54:95～104

6 Dosch R, *et al*. BMP－4 acts as a morphogen in dorsolateral mesoderm patterning in *Xenopus*. Development, 1997, 124: 2 325～2 334

7 Gilbert S F. Developmental Biology. 6th ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.,2000, 263～302

8 Irish V, Lehmann R, Akam M. The *Drosophila* posterior－group gene nanos functions by repressing hunchback activity. Nature , 1989,338: 646～648

9 Larabell C A, *et al*. Establishment of the dorsal－ventral axis in *Xenopus* embryos is presaged by early asymmetries in β－catenin which are modulated by the Wnt signaling pathway. J. Cell Biol., 1997, 136: 1 123～1 136

10 Nieuwkoop P D. Origin and establishment of embryonic polar axes in amphibian development. Curr. Top. Dev. Biol., 1977, 11:115～132

11 Roth S, Stein D, C Nüsslein－Volhard. A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorso－ventral pattern in the *Drosophila* embryo. Cell,1989, 59:1 189～1 202

12 Roth S *et al*. Cornichon and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior－posterior and dorsal－ventral pattern formation in *Drosophila*. Cell, 1995,81: 967～978

13 Ryan A *et al*. Pitx 2 determines left－right asymmetries in vertebrates. Nature,1998,394: 54～55

14 Simpson－Brose M, Treisman J, Desplan C. Synergy between the hunchback and bicoid morphogens is required for anterior patterning in *Drosophila*. Cell, 1994, 78:855～865

15 St Johnston D. The intracellular localization of messenger RNAs. Cell,1995,81: 161～170

16 Struhl G, Struhl D, Macdonald P M . The gradient morphogen bicoid is a concentration－dependent transcriptional

activator. Cell,1989,57: 1 259～1 273

17 Wolpert L *et al*. Principles of Development. London: Current Biology Ltd. Oxford,1998. 125～169

第三篇

器官形成

第九章　胚胎诱导与组织、器官形成

在机体的发育过程中，一个区域的组织与另一个区域的组织相互作用，引起后一种组织分化方向上变化的过程称为胚胎诱导（embryonic induction）。在脊椎动物的发育过程中，胚胎诱导对产生不同类型的细胞和将不同的细胞组织为不同的组织和器官都是极其重要的。

胚胎诱导现象最早是由 Spemann(1901)和 Lewis(1904) 发现的。他们发现蛙类（*Rana*）由外胚层形成晶状体依赖于其下方视杯的影响，当将正常发育为晶状体的外胚层切除，移植胚胎其他部位的外胚层到暴露的视杯上，移植的外胚层可发育为晶状体。如果在外胚层与视杯间夹入其他的组织，则晶状体的形成被阻止。如果将视杯切除，并将它移植到胚胎其他部位外胚层的下面，此处的外胚层将发育为晶状体。他们认为，视杯引起晶状体的形成，没有视杯的影响，晶状体就不能发生，晶状体发生是通过视杯的诱导作用形成的。虽然以后的实验证明晶状体的发生并不仅仅是受视杯的诱导，但有关胚胎诱导的概念就是根据最初的这些实验得出的。

在胚胎诱导相互作用的两种组织中，产生影响并引起另外的细胞或组织分化方向变化的这部分细胞或组织称为诱导者(inductor)，而接受影响并改变分化方向的细胞或组织称为反应组织（responding tissue)。诱导者的作用可能是激活那些对细胞分化所必需的特异蛋白质编码的基因。而反应组织则必须具有感受性（competence)，才能接受诱导者的刺激，从而发生分化的变化。

在动物胚胎的发育过程中存在着大量的和连续的诱导作用，它们对胚体的建成是至关重要的。其中原肠胚的脊索中胚层诱导其上方的外胚层形成神经系统这个关键的诱导作用，传统地被称为初级胚胎诱导。初级胚胎诱导的产物——神经管(如视杯)又可作为诱导者，诱导表面覆盖的外胚层形成晶状体，这称为次级胚胎诱导。而晶状体和(或)视杯又作为诱导者诱导表面的外胚层形成角膜，此为三级胚胎诱导。胚胎中其他器官的形成也经过类似的诱导过程。

第一节　初级胚胎诱导

Spemann 和 Mangold(1921—1924)在两栖类进行的一系列移植实验中发现，早期原肠胚的胚孔背唇能诱导次级胚胎的形成，并将胚孔背唇称为组织者(organizer)。它建成了胚体的中轴结构，并为此后的器官的形成奠定了胚胎发育的基础。经典的实验胚胎学认为，在原肠形成时脊索中胚层诱导其表面覆盖的外胚层形成神经板的现象为初级胚胎诱导（primary embryonic induction)。

根据近二十年来的研究，认为过去经典实验胚胎学中所描述的初级胚胎诱导，实际上是神经诱导(neural induction)，它只是初级胚胎诱导过程中的一个阶段。近年的研究结果认为，初级胚胎诱导可分为以下几个阶段：第一个阶段发生在卵裂期，为中胚层的形成和分区；第二个阶段才是背部外胚层被脊索中胚层诱导转变为神经系统的神经诱导；第三个阶段是中央神经系统的区域化(图 9.1)。关于初级胚胎诱导的详细情况，请参阅第二篇第七章。

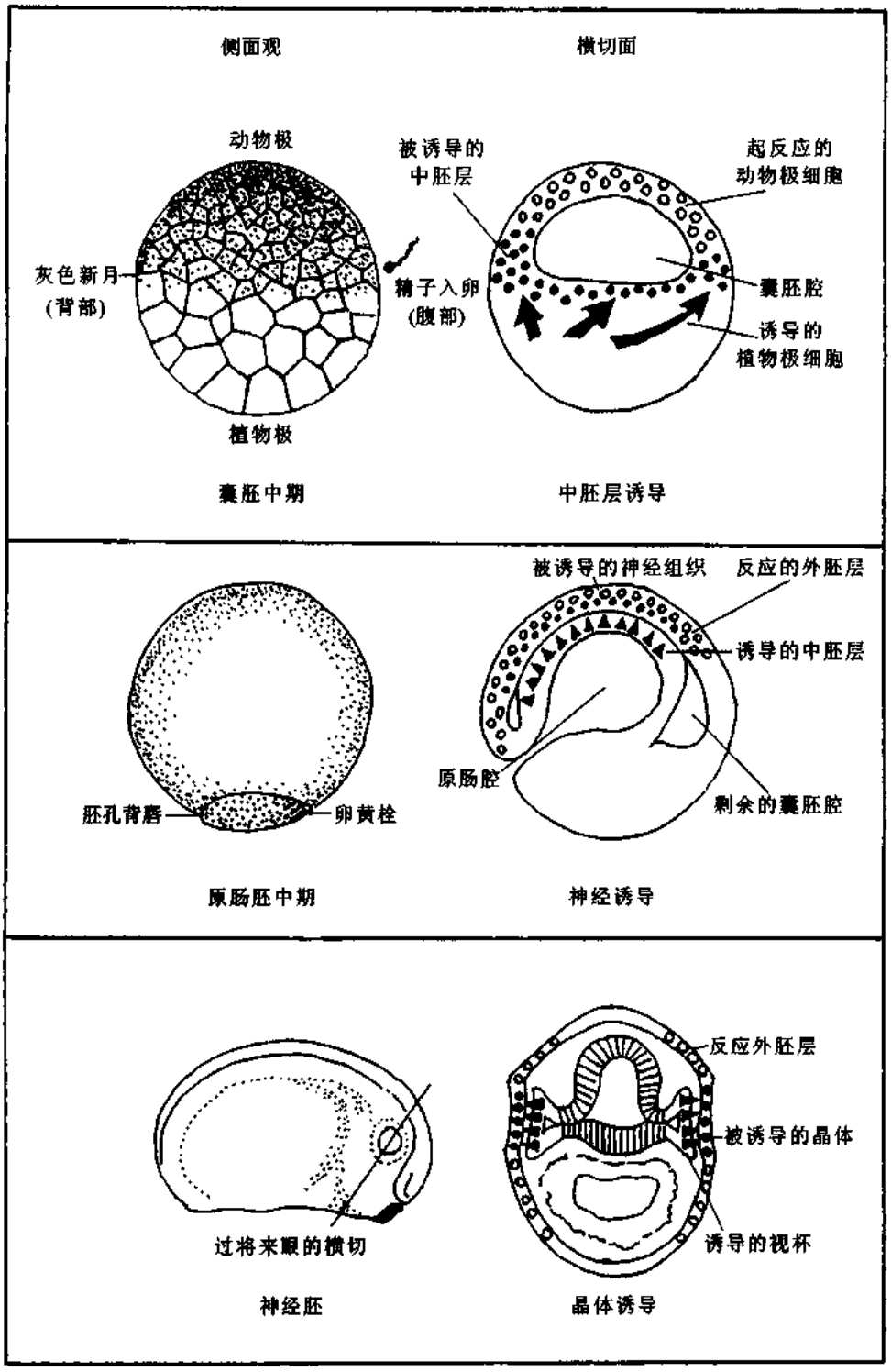


图 9.1 在两栖类发育中连续的诱导作用(仿 Gurdon,1987)

诱导组织用箭头表示;对诱导作用起反应的感应细胞用圆圈表示;实际起反应的细胞用实心圆圈表示

第二节 反应组织

胚胎诱导在任何系统中至少具有两个部分：一个是组织产生诱导刺激，另一个是组织能接受刺激并对它起反应，后者称为反应组织(responding tissues)。反应组织在胚胎诱导作用中也具有它的特异性。

一、感受性

反应组织或细胞必须具有感受性才能对诱导者或组织者的刺激起反应。如在早期原肠胚中植入的胚孔背唇能在胚胎的任何地方诱导外胚层形成神经板和胚轴。然而，当移植胚孔背唇到一个神经胚的预定表皮下，它将不再引起新的神经板的形成，这说明随着胚胎年龄的增加，外胚层失去了它们的反应能力。反应组织以一种特异方式对诱导刺激起反应的能力称为感受性(competence)。故感受性总是和特殊的刺激及相应的反应有关。感受性本身是一种分化的表现型，它从空间和时间上区别细胞。感受性和潜能(potency)的含义不同。二者的区别是感受性能通过试验进行研究分析，而潜能则不能通过实验分析，但在发育一段时间后能从所观察到的结构反映出来。

感受性有初级感受性(primary competence)和次级感受性(secondary competence)之分。前者是指尚未决定的外胚层所具有的感受性；后者是指已经决定了的组织对刺激的感受性。对不同诱导刺激，如对神经化和中胚层化的反应能力，分别称为神经感受性(neural competence)和中胚层感受性(mesodermal competence)。

1. 感受性的时间模式

体内的移植试验和体外的夹心面包法培养实验证明，神经感受性的丧失都是在神经胚开始以前，即在晚原肠胚期胚孔关闭时消失。因此认为随着发育的进展，神经感受性逐渐减弱。对美西螈的研究指出，在正常发育期间感受性可分为前后两个时期。前一时期是在适当的刺激后诱导外胚层产生前脑，而后一时期在相同的刺激下形成中脑和后脑。因此，外胚层产生前脑的感受性比产生中、后脑的感受性消失的早。当取不同发育时期胚胎的外胚层，将其放在使细胞产生亚溶解的条件下(如缺钙培养液)，结果产生"自动神经化"现象。同时发现甚至囊胚期的预定外胚层也出现神经化。而最强的神经化作用是在原肠形成早期，在神经胚开始以后就不再形成神经结构。根据上述实验结果可以认为，神经感受性的消失时间是在原肠胚晚期，但开始出现的时间尚无精确结论。

中胚层感受性也有时间的特点。由于在实验条件下能从预定外胚层诱导出中胚层。而在正常发育期间从神经板的后部发育出尾部中胚层。故认为外胚层具有中胚层的感受性。其反应的强度取决于外胚层的年龄。早期原肠胚的外胚层反应能力较强，分化出脊索和肌肉等结构。晚期原肠胚的反应能力变化，只能分化出间质细胞和血细胞等。从神经胚切下脊索，把它移植到不同胚龄的原肠中观察其诱导效应。结果发现所诱导的神经结构随着胚龄的增加而减少，但中胚层的结构却增加。表明在活体内随着胚龄的增加，神经的感受性逐渐减弱，而中胚层的感受性加强。但在体外条件下，用相同的诱导者，外胚层的中胚层感受性丧失较快。

2. 感受性的区域模式

早期原肠胚的预定外胚层在初级感受性上不表现区域特异性。但随着发育的进展，不同区域的外胚层(预定表皮)表现出不同的感受性。如晶状体、平衡器和耳囊等。这些不同区域的感受性最初有相互重叠的部分，但随着发育逐渐局限于一定的区域。这仅限于次级感受性的范围内。

3. 感受性的种间差异

由于两栖类不同种的外胚层的感受性存在差异而产生不同的、甚至互相矛盾的诱导结果。如无尾类和有尾类

对杀死的诱导者的感受性不同，无尾类没有感受性，而有尾类有。

4. 遗传因子

感受性受遗传的控制。如口部的表皮在蝾螈形成平衡器，而蛙类形成吸盘。它们是原肠顶前部诱导的产物。如果将蛙类早期胚胎的外胚层移植到蝾螈未来的口部区域，则它被诱导为蛙的吸盘；反之，若将蝾螈胚胎的外胚层移植到蛙胚的未来口区，则被诱导为平衡器(图 9.2)。表明诱导产生的类型受反应组织遗传因子的制约，其感受性有种的特异性。同时表明诱导作用可跨越种的界限。

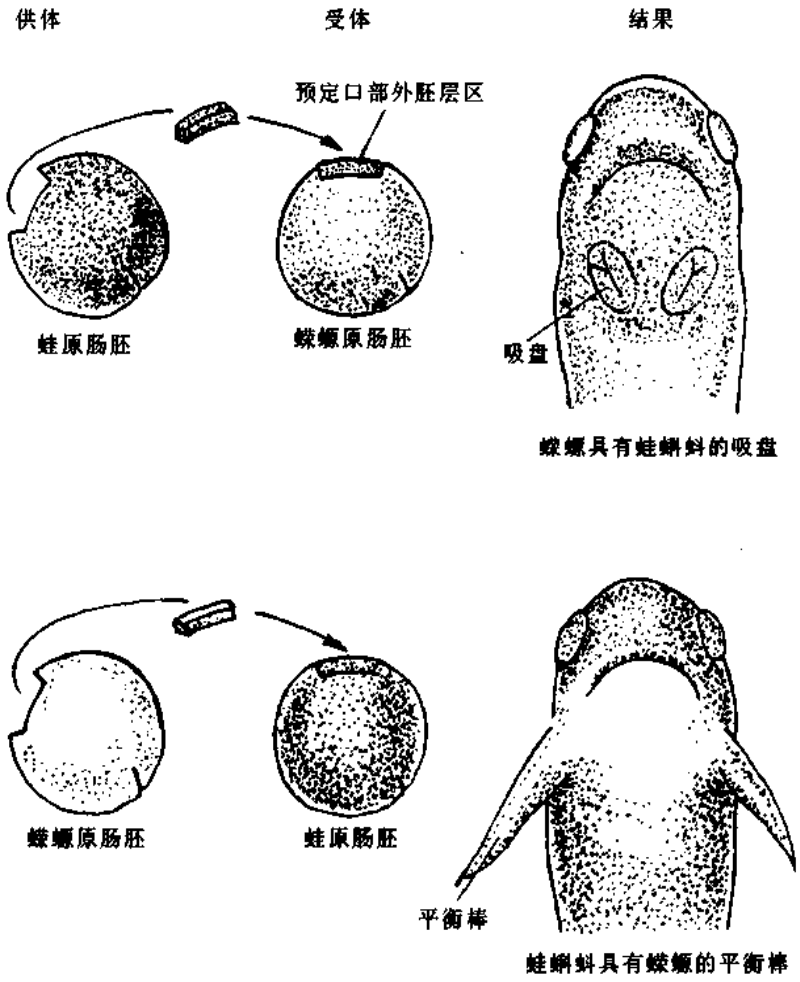


图 9.2 诱导作用的遗传特异性

在蝾螈和蛙原肠胚预定口部外胚层区之间的种间移植，导致蝾螈的幼体具有蝌蚪的吸盘，和蝌蚪具有蝾螈的平衡棒。(仿 Hamburgh，1970)

5. 环境因子

在培养液中加入 LiCl 处理外胚层，可导致外胚层感受性的变化。将用锂处理过的外胚层与胚孔背唇或脊索中胚层接触后，前脑的诱导被抑制，而中、后脑和脊髓的结构增多。同时发现中胚层的感受性加强。

6. 细胞周期

用过量的胸腺嘧啶核苷阻断东方蝾螈早期原肠胚外胚层细胞周期 24 小时，再解除抑制 3 小时后，以豚鼠骨髓提取液作为诱导物质进行处理，96% 的外植块分化为中胚层的组织。在不阻断细胞周期的情况下，外胚层细胞经

培养24小时后，对骨髓提取液失去感受性。认为这是由于阻断细胞周期可能使新蛋白质的合成受到抑制的缘故，因为发育不能进行，故维持原有状态，保持其反应能力。处于不同时期的同步化细胞的反应能力差别明显，依次是：早S时相＞G1－S时相＞G2时相。而进入G2时相的细胞基本上已丧失了反应能力。

二、自动神经化

自动神经化是在没有诱导组织或不具诱导活性的化学物质存在的情况下，外胚层移植块出现神经化的现象。当用生理盐水长时间处理外胚层，引起部分细胞解体，同时未解体的细胞出现神经化。因此认为这可能是部分解体的细胞释放出诱导刺激物影响未解体的细胞，引起它的神经化。其他非生理条件（如高pH、缺钙和低渗等）及某些有毒因子（如氨、尿素和二氧化碳等）和机械损伤等均可引起自动神经化。同时还发现，所产生的神经化是与"亚致死细胞溶解"的程度成比例，活细胞与不可逆的溶解细胞越接近，则神经化的趋势越大。但以后的实验证明并不完全如此。对于细胞释放大分子来说，形态上的变化并不是必须的。用抗补体处理细胞后，可见RNA颗粒通过"看来是完整的"细胞膜消失在介质中。因此，产生自动神经化的机制可能是从受损伤细胞释放出活性因子对存活细胞产生诱导作用的结果。

三、自动中胚层化

外胚层细胞除自动神经化外，还有自动中胚层化现象。如用锂（LiCl）处理外胚层并结合解离（dissociation），经常从外胚层分化出肌肉、前肾和血细胞等中胚层的结构。这可能是由于外胚层中存在一种弱的中胚层化倾向，只有在锂抑制了其神经化的倾向以后，中胚层化才能表现出来。

第三节　异源诱导者

能诱导原肠胚外胚层形成一定的结构，并具有区域性诱导效应的组织称为异源诱导者（heterogeneous inductor）。它们虽不是组织者，却具有与组织者相当的形态发生效应，而且无种的特异性。它们包括许多成体和幼体的多种组织，广泛存在于动物界，甚至某些有机和无机化合物。最初发现成体组织对两栖类原肠胚外胚层具有神经诱导作用的是Holtfreter（1934）和庄孝德（1939）。异源诱导者对于胚胎诱导的研究十分重要。由于异源诱导者来源广，组织量多，取材方便，可提纯较多的具有诱导活性的化学物质，便于深入研究它们对细胞分化所起的作用。为从分子水平研究胚胎诱导和细胞分化奠定基础。对异源诱导者的研究证明，它在预定外胚层中诱导出的组织的分化范围远远超过正常发育中外胚层的分化，包括大多数由中胚层和内胚层分化的组织。

一、异源诱导者的类型

根据异源诱导者在早期胚胎中的诱导效应，可分为两类。

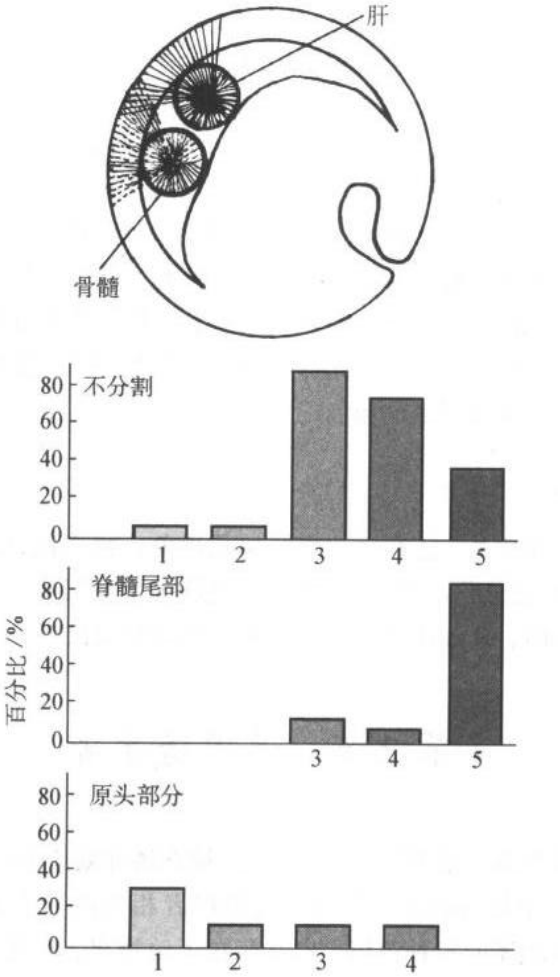
1. 植物极化因子（vegetalizing factor）

包括中胚层诱导，主要形成中胚层的结构，如肌肉，脊索等。此类物质如豚鼠的骨髓。

2. 神经化因子（neuralizing factor）

诱导前脑、中脑、后脑和脊髓。如豚鼠肝以及蛙卵和胚胎。

用异源诱导者的研究证明，神经诱导的区域性可能受一种双重梯度的支配。如豚鼠的骨髓只诱导中胚层的结构，而豚鼠的肝诱导前脑的结构。当将二者混合植入早期原肠胚的囊胚腔中，这种混合物将诱导所有正常的前脑、后脑、脊髓和躯干部中胚层的结构(图 9.3)。



1 前脑、眼、鼻和平衡器
2 非特异的脑
3 后脑、耳泡
4 头部肌肉
5 躯干部器官、脊索、体节和脊髓

图 9.3 异源诱导者豚鼠肝(神经化诱导者)和豚鼠骨髓(中胚层化诱导者)植入蝾螈囊胚腔产生的双梯度诱导学说

异源诱导者的来源及作用见表 9.1。

表 9.1　异源诱导者的来源及作用

诱导类型	来　源	参考文献
植物极化因子	豚鼠骨髓(酒精提取物)	Toivonen(1953)
(vegetalizing factor)	9～13 天鸡胚(30kDa 蛋白)	Born 等(1972)
		Schwartz 等(1981)
	鱼鳔	Kawakami 等(1976 1977)
	爪蛙培养过细胞的培养基	Smith(1987)
	蜂螺肝	庄孝德(1939)
	人肝脏、甲状腺	Holtfreter(1934)
	豚鼠淋巴结	Rotmann(1942)
	HeLa 细胞人血清培养	Saxen 和 Toivonen(1957)
	豚鼠肾，鱼胃	Toivonen(1940)
	大鼠骨髓	Saxen 和 Toivonen(1956)
	豚鼠心、肝、肾和小肠	王亚辉(1963)
	蛙皮肤	Fujii(1941)
神经化因子	豚鼠肝	Toivonen 和 Saxen(1955)
(neuralizing factor)	HeLa 细胞	Saxen 和 Toivonen(1958)
	爪蛙卵和胚胎	Faulbarber(1972)
		Janeczek 等(1982)
	小鼠肾	庄孝德(1939)
		Mifune(1955)
	蜂螺脑、心	Holtfreter(1934)
	蛙腹部皮肤	Okada(1948)
	鸽肌肉	Kuusi(1953)
	豚鼠肾	Toivonen(1946)
	鸡胚	Tiedmann 和 Tiedmann(1956)

二、影响异源诱导者作用的因素

1. 年龄

从不同发育时期取得的相同组织的诱导能力发生一定的变化。鸡胚胎期的视网膜为前脑结构的异源诱导者，而刚孵化和成体的视网膜为中、后脑和躯体部的异源诱导者。小鼠胚胎和成体的肾和肝组织的诱导效应也有类似的变化。

2. 饥饿

豚鼠饥饿三天的肝组织，中、后脑和躯体部异源诱导者的效应降低，而前脑异源诱导者的作用加强。经过长期饥饿的豚鼠的肾的诱导作用也表现出类似的变化。

3. 其他因子

组织的恶性变化，体外培养细胞培养条件的变化，X 光照射及芥子气处理引起的组织的变化等均可使其诱导活性与正常组织的不同。

另外，当同一异源诱导者在不同浓度或不同时间处理时，将对发育产生极其不同的影响。如植物极化因子浓度增加 100 倍或及时处理，能引起爪蛙外胚层形成大量的肌肉和神经，相对地血液在低浓度下就能形成，表皮形成则完全不需要这种诱导者。

第四节 次级诱导和三级诱导

初级诱导的相互作用虽然很复杂，但尚不能构筑整个胚胎。然而神经管、背部中胚层和咽内胚层及其他组织的形成为急剧到来的大量的诱导事件创造了条件。通过一种组织与另一种组织的相互作用，特异地指定它的命运称为次级诱导(secondary induction)。次级诱导的产物又可作为诱导者，通过与相邻组织的相互作用进行三级诱导(tertiary induction)。一旦一种组织被诱导，它能再诱导其他组织。已证明脊髓运动神经元的形成正是这样。在神经管被诱导后，它仍然能对来自脊索的诱导信号起反应。那些邻近脊索的神经管细胞(最腹部中线处的细胞)变为底板细胞。如果把脊索的片段移植到神经管的侧面，那么将在其侧面诱导形成另一组底板细胞。这些底板细胞一旦被诱导，它又可在其任一侧诱导运动神经元的形成。另一个熟知的例子是眼发育中一系列的诱导关系。视泡是由原肠顶的前端诱导前脑向两侧突出而成。视泡形成后又诱导其上覆盖的外胚层形成晶状体。晶状体和(或)视泡又诱导晶状体表面覆盖的外胚层形成角膜。神经管是由初级诱导者诱导而成。其前端的衍生物(视泡)又诱导出次级结构(晶状体)，故神经管又称为次级诱导者(secondary inductor)。随后次级诱导的产物(晶状体)又诱导三级诱导产物(角膜)的形成，故晶状体又被称为三级诱导者(tertiary inductor)。类似的诱导系统也见于鼻、耳和其他器官的发育中。因此，整个诱导链开始于原肠顶(初级诱导者)的作用。由于在神经板的不同部位形成特异区域性的次级诱导者，这样由来自各个次级诱导者起始的诱导链形成该区所特有的器官。

第五节 邻近组织的相互作用

邻近组织的相互作用(proximate tissue interaction)根据其性质可分为两种类型：允许的相互作用和指令的相互作用。

(1) 容许的相互作用(permissive interaction) 在这里反应组织含有所有要表达的潜能，它只需要一个环境允许它表达这些特性。虽然它的表达需要某些刺激，但这不能改变它的后生型发育方向。如许多组织的发育需要一种固体的、含有纤连蛋白(fibronectin)和层粘连蛋白(laminin)的基质。纤连蛋白和层粘连蛋白只是刺激细胞的发育，但并不改变产生的细胞的类型。

(2) 指令的相互作用(instructive interaction) 这种相互作用改变反应组织的细胞类型。在这里反应组织的发育潜能不稳定，其发育方向和过程取决于接收的诱导刺激的类型。如在脊索诱导神经管的底板细胞的形成中，所有的神经管细胞都能对脊索的信号起反应，但只有那些邻近脊索的细胞被诱导。这些被诱导的细胞接收信号后表达一组不同于它们在未与脊索接触时表达的基因。大多数指令的相互作用的四个主要特性是：①在组织 A 存在的情况下，反应组织 B 以一定的方式发育。②在缺少组织 A 的情况下，反应组织 B 不以那种方式发育。③在缺少组织 A，但组织 C 存在的情况下，组织 B 不以那种方式发育。④在组织 A 存在的情况下，正常将不同发育的组织 D 被诱导，改变得像组织 B 一样发育。

一、上皮和间质的相互作用

上皮和间质结合形成由两个胚层组成的器官原基。间质细胞围绕于上皮的周围或衬附于上皮之下，对上皮衍生物的分化起重要的作用。上皮可取自任一胚层，而间质通常是来自中胚层或神经嵴组织。上皮－间质相互作用的一些例子列入表 9.2。

表 9.2　一些上皮－间质的相互作用

器　官	上皮成分	间质成分
皮肤的结构(毛发、羽、汗腺、乳腺)	表皮(外胚层)	真皮(中胚层)
附肢	表皮(外胚层)	间质(中胚层)
消化管器官(肝、胰、唾液腺)	上皮(内胚层)	间质(中胚层)
咽部及与呼吸相关的器官(肺、胸腺、甲状腺)	上皮(内胚层)	间质(中胚层)
肾	输尿管芽上皮(中胚层)	间质(中胚层)
牙齿	颌上皮(外胚层)	间质(神经嵴)

1. 间质指令表皮的分化

现以皮肤结构的诱导作用为例。皮肤是由来自外胚层的表皮和位于其下方的来自中胚层的真皮两部分组成的。鸡的皮肤产生三种主要的皮肤结构，它们几乎完全是由外胚层细胞形成的，胸部宽大的羽毛，大腿窄的羽毛和足的鳞片及爪。它们在成体上的形态虽有显著的区别，但胚胎的来源却十分相似(图9.4)。当把鸡胚的表皮和间质彼此分离以后，然后以不同的方式再把它们重

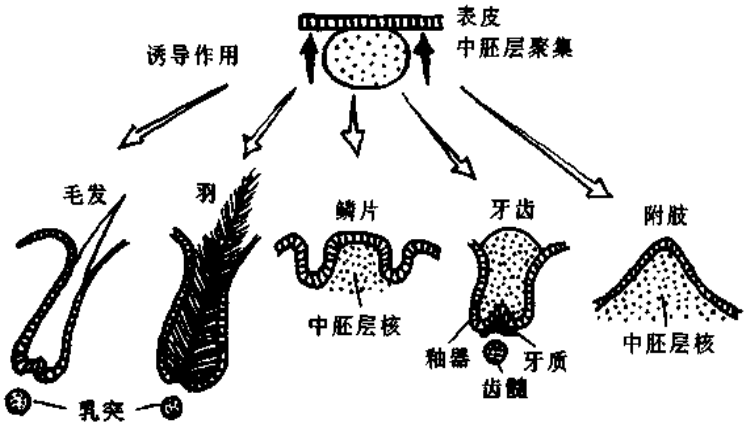


图 9.4　脊椎动物各种上皮形成图解

组。结果翅的外胚层与翅的间质结合生长出宽大的羽毛；如果与大腿部的间质结合生长出窄的羽毛；如果与足部的间质结合则生长出鳞片(图 9.5)。在这里同一类型的外胚层根据中胚层所取的区域发育。间质具有一种指令性的作用。这个结果的重要意义在于，它表明在正常情况下形成羽毛的外胚层中包含了形成鳞片的潜能。这两种结构的形态尽管不同，但其主要组成都是角蛋白(keratin)，是表皮细胞产生的特异蛋白质。鳞片主要是爬行类皮肤的衍生物，是比羽毛更原始的结构。因此推测鳞片在进化上是羽毛的前身物。鸡胚的表皮根据中胚层间质的指令，在遗传上具

有产生两种结构的能力，中胚层可以指令表皮从含有角蛋白的细胞装配成鳞片或羽毛的结构。它引起反应细胞中不同的基因起作用。

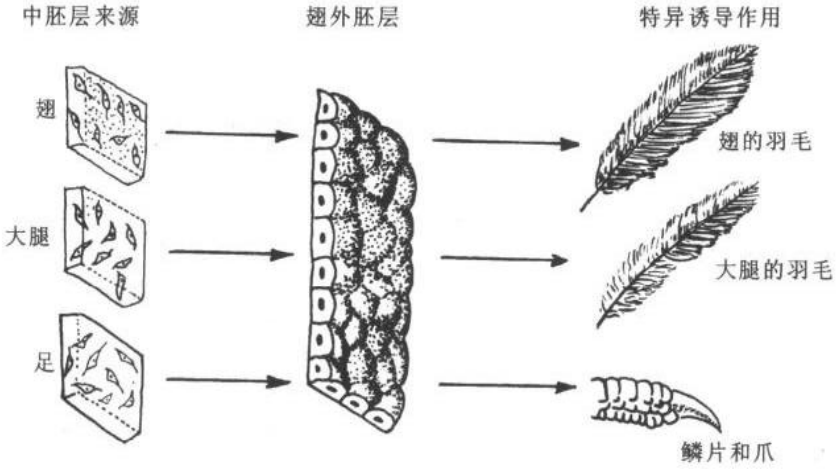


图 9.5 间质指令表皮诱导作用的区域特异性

由外胚层形成皮肤结构的类型是由中胚层所处的区域位置决定的

在异种移植的情况下，表皮细胞的反应受该种本身遗传性的制约。当从鸡胚中分离出正常预定变为角膜的外胚层，并把它与鸡皮肤的中胚层组合时，外胚层产生鸡皮肤典型的羽毛的芽基。当鸡的同一预定角膜外胚层与小鼠的皮肤中胚层结合时，也出现羽毛的芽基(图9.6)。小鼠的中

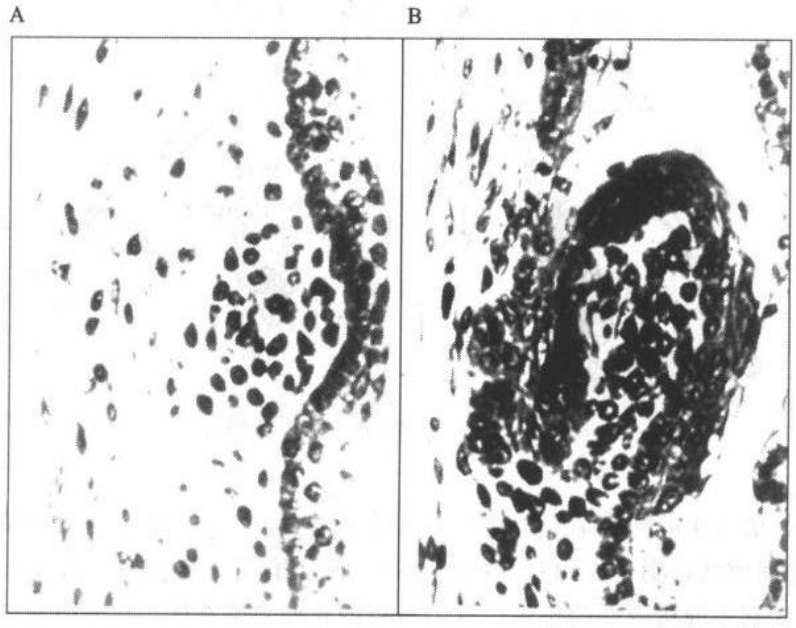


图 9.6 异种移植实验证明间质指令表皮诱导作用的遗传特异性

A. 17 天鸡胚角膜切片 B. 在孵育 5 天时此眼的预定晶状体被早期小鼠胚胎的腹侧部真皮所置换。聚集的小鼠胚胎细胞直接位于鸡胚表皮下方。由鸡角膜上皮形成羽毛原基，其中含有小鼠的细胞

胚层已指令鸡的角膜形成一种皮肤的结构——羽毛。虽然，间质送出的指令能穿越种的屏障。但上皮的反应是该种特异的。因此，器官类型的特异性(羽毛或鳞片)通常是由该种的间质控制的，而种的特异性通常又是被反应的上皮控制的。

表皮的分化还依赖于异源的间质。这已被用于产生一种长期丧失的结构——母鸡的牙齿。5天龄鸡胚形成颌区(第一或第二咽弓)的上皮被分离，并与16～18天小鼠胚胎臼齿的间质组合。将重组的组织彼此粘连，放在小鼠的眼前房中进行培养。几个重组物形成了完全的、不同于哺乳动物的牙齿。鸡的咽弓细胞不形成牙齿已近约10亿年了，它们仍然保持了这种遗传的潜能，在合适诱导者的作用下起反应形成牙齿。

2. 间质指令上皮的分化

在消化系统和呼吸系统的发育期间，间质指令上皮分化的区域特异性至关重要。在内胚层管的形态发生中，内胚层上皮对不同区域中特异的间质起不同的反应。因而使消化管和呼吸管能在不同的区域发育出不同的结构。由于消化管在不同区域遇到新的间质，它分化为食管、胃、小肠和结肠。呼吸系统的发育极其明显地看到这种指令性的相互作用，间质对上皮的发育产生特异的影响。在哺乳动物的发育中，它表现出两种明显不同的反应方式。在颈部它直直地生长，形成气管。在进入胸腔以后，它分支形成两个支气管和以后的肺。呼吸道上皮在它分开形成两个支气管以后能被分离，而且两侧能被不同的处理。当右侧的支气管保留它的肺间质，而左侧的支气管被气管的间质所包围时，右侧的支气管在肺间质的影响下增殖和分支，而左侧的支气管在气管间质的影响下继续以不分支的方式生长。因此，呼吸道上皮是极其可塑的，即使在与其他器官的间质结合时，也能发育成该间质的器官(图9.7)。

二、间质和腺上皮的相互作用

上皮与间质的相互作用也发现于产生管的器官的形成中，如一些腺体，甲状腺、胸腺、唾液腺、乳腺、胰和肝以及非腺体的肺和肾等。

1. 唾液腺

哺乳动物的唾液腺(salivary gland)包括腮腺、下颌下腺和舌下腺各一对。现以下颌下腺为例说明其发育过程。最初的原基是一对杯状上皮芽，从舌的两侧向下生长进入结缔组织层。芽体不久被浓集的间质细胞所包围，形成一结缔组织鞘。腺原基的上皮部分开始分支，在每个分支的末端形成结节状增厚，生成叶。叶重复分叉形成分泌小球，而分支则形成管道系统。

可在体外对下颌下腺上皮和间质分离培养以证明上皮的形态发生和间质之间的依赖关系。如将上皮和间质分别培养，二者均有生命力，可以进行细胞分裂，但都不进行正常的形态发生：上皮不能分支，间质也只形成一层能增殖的细胞。当将两种组织靠近培养时，则间质就围绕上皮芽，后者继续分支并形成分泌腺泡。在一般情况下，只有同源间质使唾液腺上皮芽按唾液腺特有的类型进行分支。如在体外向小鼠唾液腺上皮的一侧加入唾液腺间质，另一侧加肺间质，结果是前者进行唾液腺状的分支，而后者不分支(图9.8)。另有实验证明，如将小鼠唾液腺间质与小鼠乳腺上皮结合在一起培养，结果乳腺上皮分支并形成唾液腺特有的结节状分支，而不是乳腺特有的形态。但这只是形态上的区别，还不知是否已发生唾液腺生化方面的分化。上述唾液腺间质促进异源(乳腺)上皮分支的形态发生的能力表明，这种间质对于唾液腺的形态发生具有关键的和独特的促进作用。其他大部分间质不能使唾液腺上皮正常生长和分化。

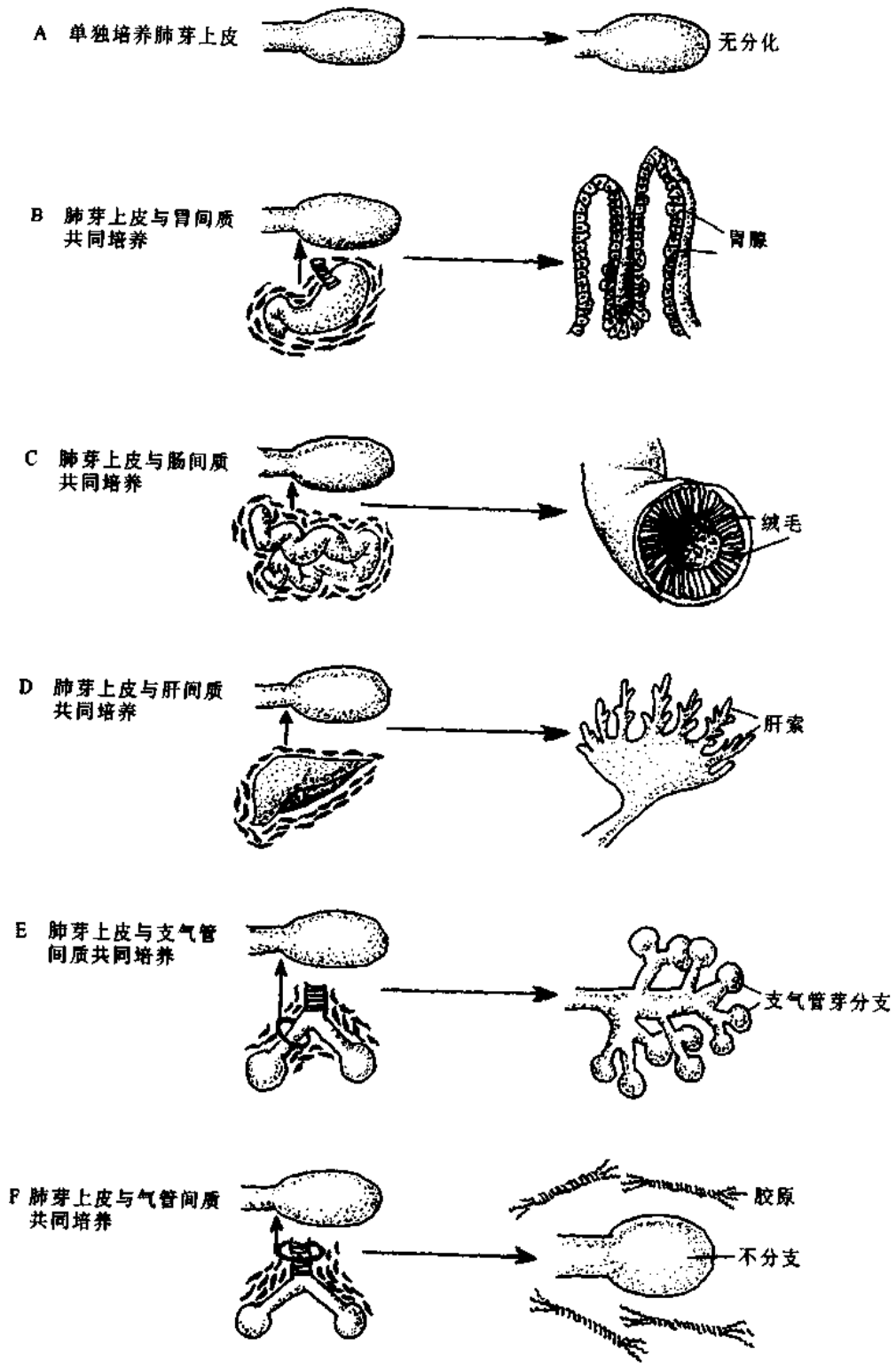


图 9.7　预定肺上皮能根据间质的来源分化

A. 当肺上皮在缺少间质细胞情况下培养时不进行分化　B~F. 肺上皮根据不同间质的特性进行分化

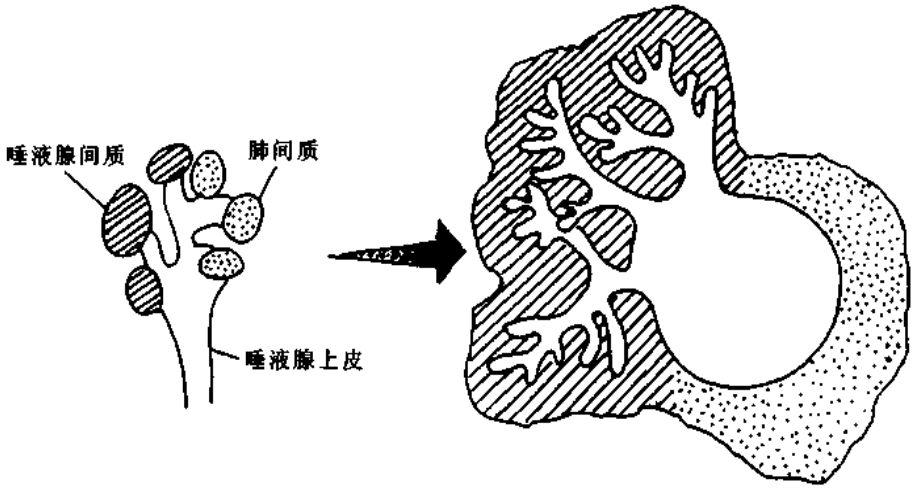


图 9.8　唾液腺上皮的发育

一侧与唾液腺间质接触，另一侧与肺间质接触进行培养，结果和唾液腺间质接触的上皮呈现唾液腺特有的分支，而和肺间质接触的上皮则完全不发育出分支

故很长一段时间都认为唾液腺的发育属于指令的相互作用，唾液腺间质是唾液腺形态发生特异的促进者。但从 20 世纪 70 年代以来的实验证明，它的发生对间质的要求并不十分严格。故应属于容许的相互作用。其他研究证明，唾液腺上皮对同源间质的要求并不是十分专一的。当把小鼠的下颌下腺上皮和它的肺间质一起培养时，也会分支并形成分泌腺泡。但是，在达到同样的形态发生水平时，所需肺间质的量比下颌下腺的要多得多。以上结果给人们的启示是唾液腺上皮所具有的分支特点受遗传性支配，是已决定了的。而间质的作用只是提供它形态发生所需的适宜环境。唾液腺间质在促进异源上皮中所显示的作用和唾液腺上皮对大部分间质所表现出的麻木状态（不起反应）可以表明：①唾液腺间质能特异地引起上皮分支；②唾液腺上皮必须接受足够的间质刺激才能表达其分支的能力。大部分间质不能满足这种要求，唾液腺间质则很容易满足这种要求，而肺间质只有在大量存在的情况下才能满足这种要求。

2. 肾

羊膜动物的后肾是由输尿管芽和生后肾间质这两个来自中胚层的组织相互作用和互惠诱导形成的（图 9.9）。在体外条件下证实这种相互的诱导作用（reciprocal induction）。将输尿管芽和生后肾间质彼此分离，并将它们单独或在一起培养。在缺少间质的情况下，输尿管芽不分支。在缺少输尿管芽的情况下，间质并不浓缩形成肾管。而将它们放在一起培养时，输尿管芽生长并分支，间质也形成肾管。虽然肾小管的分化并不完全需要输尿管的诱导，大量的其他组织，如神经管、唾液腺间质和头部间质等将使后肾间质形成肾小管。这种相互作用是高度容许性质的。但输尿管芽的分支只有在生后肾间质的指令性的相互作用下才能进行。即使那些在其他组织中能诱导上皮分支的间质（如唾液腺间质）也不能引起输尿管芽分支。以上结果说明生后肾间质是早已决定了的，但要表现其决定，必须有其他组织的相互作用。根据在鸡中肾诱导作用的实验结果提出，这种决定是在发育早期与内胚层相互作用的结果。

间质细胞转变成上皮是器官发生中不同寻常的事件，它发生于肾、生殖腺（在其内的间质形成性索）和间皮（是由衬附于体腔内的间质细胞产生的）中。这样的变化通常涉及细胞外基质物质成

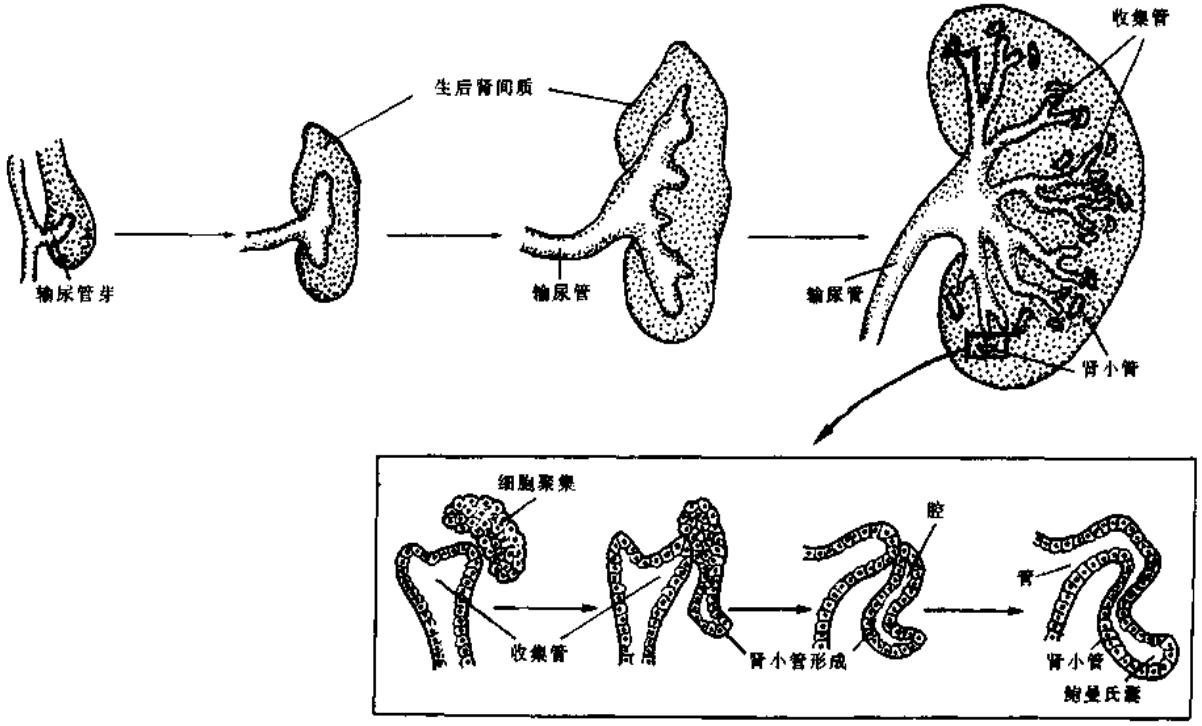


图 9.9 哺乳动物肾发育中互惠的诱导作用

随着输尿管芽进入生后肾间质，间质诱导输尿管芽分支。在分支的顶端上皮诱导间质聚集和形成肾小管的腔

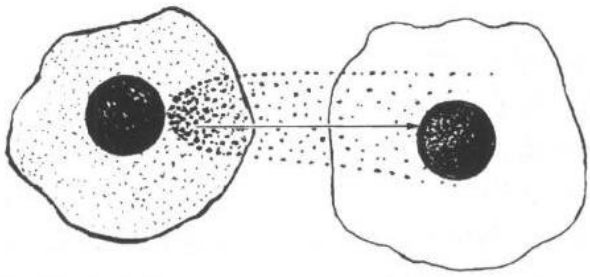
分的改变。未被诱导的生后肾间质分泌一种由大量纤连蛋白和Ⅰ型、Ⅲ型胶原组成的细胞外基质。在发生诱导时，这些蛋白质消失，被层粘连蛋白和Ⅳ型胶原组成的基板所代替。细胞骨架也由一种间质细胞所特有的变为一种典型的上皮细胞的。通过这样的方式，松散的间质细胞被连接到一起，在基板上形成一种有极性的上皮。另外，在这些变化之前，发现新诱导的生后肾间质一种膜的蛋白多糖 syndecan。当输尿管芽刚进入生后肾间质区时，这种细胞表面的蛋白多糖首先被发现于围绕输尿管芽的间质细胞周围。随着输尿管芽开始其第一次分支，分支周围的整个间质区呈 syndecan 阳性染色，直接与输尿管芽相邻的细胞层最强的染色。用不同种的诱导者和用 syndecan 的种特异的抗体研究证实，syndecan 是在细胞外合成的。它的合成可能对间质细胞的聚集和定型上皮是重要的。如果肾原基中蛋白多糖的合成被抑制，那么间质细胞停止形成上皮的肾管，而且输尿管芽进入间质区后也不分支。

虽然一直认为输尿管芽通过激活间质中的某一基因的表达来起始这一系列的变化，但我们现在仍不知道被输尿管芽合成的诱导物质，在反应的间质中这种物质的受体，或在这个相互作用中被激活的基因是什么。最近，在 Wilm's 肿瘤病人中鉴别出一个基因，*WT2 - 1*。它的缺失或突变引起这种涉及胚胎肾细胞的癌症。它编码的蛋白质具有锌－指状转录因子特有的序列。原位杂交证明，这个基因正常在肾、生殖腺和间皮的聚集的间质细胞中表达。因此认为它是启动从间质细胞变为上皮的一系列变化的最好的候选者。在人的肾中，*WT2 - 1* 的 mRNA 即不在输尿管芽中，也不在未受诱导的间质中表达。然而，它极容易在浓集的间质细胞中和 S－形的肾管上皮中检测出来。

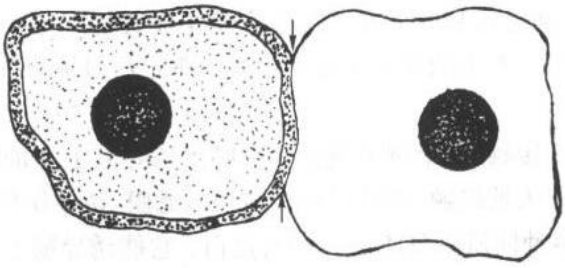
三、间质和上皮相互作用的机制

1. 上皮——间质诱导中贴近的实质

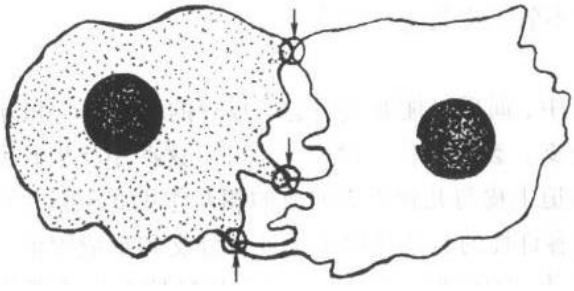
在贴近的诱导作用中，设想有三种类型的相互作用：细胞与细胞的接触，细胞与基质的接触和可溶性信号的扩散(图 9.10)。



诱导者产物从一个细胞扩散到另一个细胞



一个细胞与另一个细胞的基质接触



诱导细胞与反应细胞间质膜的接触

图 9.10　诱导相互作用可能发生的三种方式

(1) 细胞与细胞的接触

输尿管芽诱导肾小管好像是依赖于它们细胞的紧密接触。把生长的诱导者和间质置于微孔滤

膜的两侧，发现在诱导者对面的间质培养物中形成肾小管。在横切片中可以看到诱导组织的小突起穿过滤膜与间质相接触。这种诱导组织和反应组织细胞间的接触也见于牙齿的诱导作用和下颌下腺的诱导作用中。

(2) 细胞与基质的接触

在一些器官的发生中，可以看到一种类型的细胞的细胞外基质能引起另一组细胞的分化。研究发现角膜上皮的分化好像是被晶状体囊的细胞外基质诱导的。死的晶状体囊只要胶原存在，它们就一直起作用。几乎所有来源的胶原都能诱导角膜合成它们的基质。当把滤膜放入晶状体囊和角膜上皮之间时，上皮细胞伸出突起穿过滤膜与晶状体囊接触。这些结果提示，角膜上皮细胞的表面从富含胶原的晶状体囊接收了一些指令。

细胞外基质也能为次级诱导提供位置的信息。在 5～6 天鸡胚中，皮肤的真皮细胞开始在一些特定的位点，以一种精确的模式聚集。这些位点是羽毛发生的地方。每一个位点处于前一排的两个位点之间，呈六边形的晶格。每个聚集点就是一个羽毛芽基(feather germ)。实验推测，真皮细胞的聚集是由间质细胞沿事先形成的胶原基质迁移形成的。用胶原酶处理背部皮肤，可破坏胶原六边形沉淀的模式和抑制真皮细胞的聚集。近年的研究证明，在正常的皮肤发育期间，Ⅰ型和Ⅱ型胶原及纤连蛋白均匀地分布于真皮和表皮连接处。由于胶原从羽毛和鳞片芽基形成的区域中消失，羽毛和鳞片继续发育。在不形成羽毛和鳞片的位置，胶原的积累增加。此后不久，细胞粘连分子 N－CAM 在真皮中将来羽毛原基的下方以点状的模式被表达。有人认为，N－CAM 蛋白质在表皮下特异地聚集真皮细胞。看来细胞外基质在皮肤中决定次级诱导的位点中是非常重要的。

(3) 可溶性信号的扩散

一些诱导系统并不需要接触，一个例子是脊索中胚层诱导其上方的外胚层形成神经管。在诱导组织和反应组织的细胞间未见接触，而且即使其间加入滤膜，诱导作用也能发生。

在胰的发育中，已从各种间质中分离出一种糖蛋白，它能诱导胰上皮的分化。这种间质因子能结合于琼脂糖树脂。当胰脏上皮碎片的表面基部粘连于这样的树脂时，它们合成 DNA，并产生含酶的，具有已分化的胰细胞特点的分泌颗粒。相同的上皮碎片粘附于未包裹此间质因子的树脂时，不产生分泌颗粒。这种影响是间质因子特有的，其他蛋白质将不诱导这种分化。那些结合于含有间质因子树脂的上皮细胞将分裂和分化，而形态发生对细胞分化的发生并不是必须的，细胞将产生它们特定的产物，而不管上皮是否已分支。

2. 分支形成的机制

在肾和许多器官的发育中，间质可能通过引起上皮管的分支与它相互作用。当上皮向外生长被一裂隙分开的时候产生分支。裂隙的任一侧产生小叶。这些小叶生长而产生分支。上皮管的分支依赖间质的存在。在呼吸道上皮与几种不同间质的相互作用属于指令性的。然而，在大多数情况下，这些相互作用仅仅是容许性的。这些原基将进行分支和形成腺泡，但它们需要来自间质的支持(图 9.11)。现在有人认为，间质通过劈开小叶和有选择地消化掉部分上皮组织的基板引起裂隙和分支的形成。

裂隙的形成好像是由胶原控制的。Ⅲ型胶原纤维是由间质细胞产生的，它只聚集在小叶的裂隙中。另外，分支的伸长也可以通过保留或除去胶原分子被人工地调节。图 9.12 显示在防止胶原酶降解，促进胶原酶降解和内源的胶原酶不除去过量的胶原时分支和裂隙的形成情况。

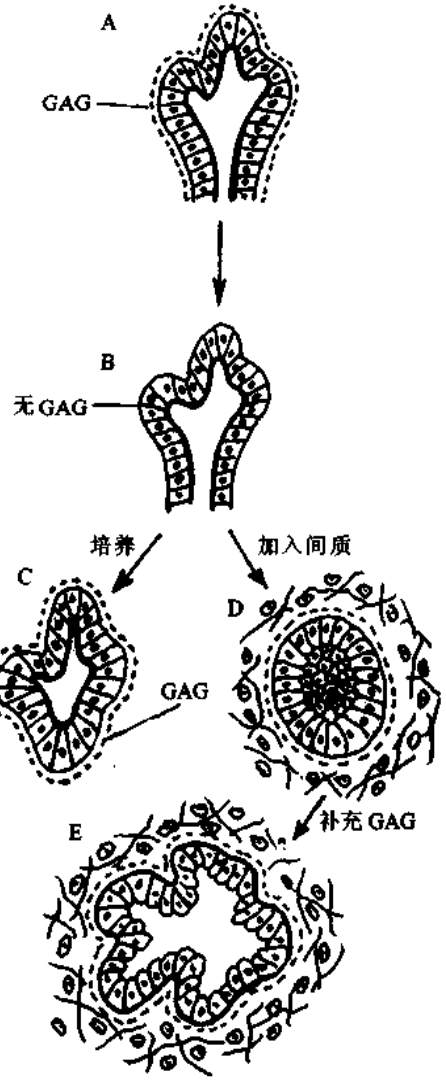


图 9.11　GAG 和间质对唾液腺形态发生的共同效应

A. 唾液腺上皮具有完整的 GAG 层　B. 酶处理除去 GAG　C. 在缺少 GAG 时，补充 GAG 后培养此上皮无形态发生出现　D. 在缺少 GAG，只加入间质时，培养的上皮聚集，仍无形态发生　E. 在加入间质后，再补充 GAG，短时间内重新开始分支的形态发生

胶原起始这种分支的机制还不清楚。有人提出假设，间质细胞通过它们的牵引与胶原纤维连接以形成切入小叶上皮的嵴，从而形成裂隙。由于更多的间质细胞迁入和通过它们的牵引进一步变成小叶，因此这些裂隙被限定下来。起初裂隙的形成并不依赖上皮细胞的增殖。胶原纤维可能也负责裂隙发育为明显区分的分支。胶原纤维还可能起一种保护上皮细胞基板不受间质细胞分泌的透明质酸酶损害的作用。实验证明间质细胞的确消化小叶的氨基多糖(Glycosaminoglycans，GAGs)。而顶部的 GAGs 比裂隙中的更敏感。基板的破坏将在破坏区刺激有丝分裂增加，使分支生长延伸。在这个模式中(图 9.13)，间质细胞与上皮的细胞外基质相互作用将决定器官的分支情况。

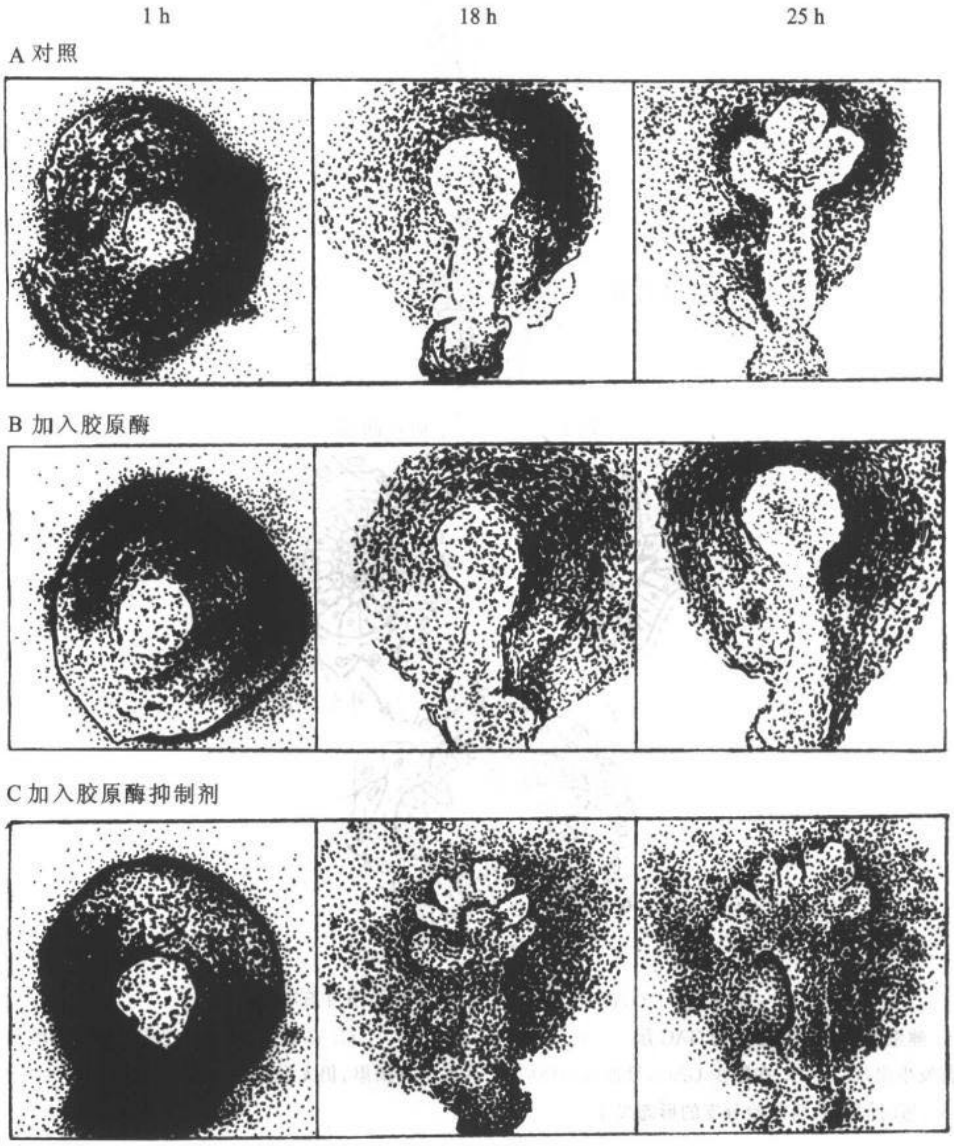


图 9.12 间质的胶原控制上皮裂隙的形成

12 天小鼠唾液腺原基在培养后 1、18 和 25 h 进行观察。A. 正常发育，示三个大的小叶 B. 当外源的胶原酶(5μg/mL)加入培养基中时，小叶生长，但不分支 C. 当胶原酶抑制因子(5μg/mL)加入培养基中抑制内源胶原酶的活性时，形成超数量的分支

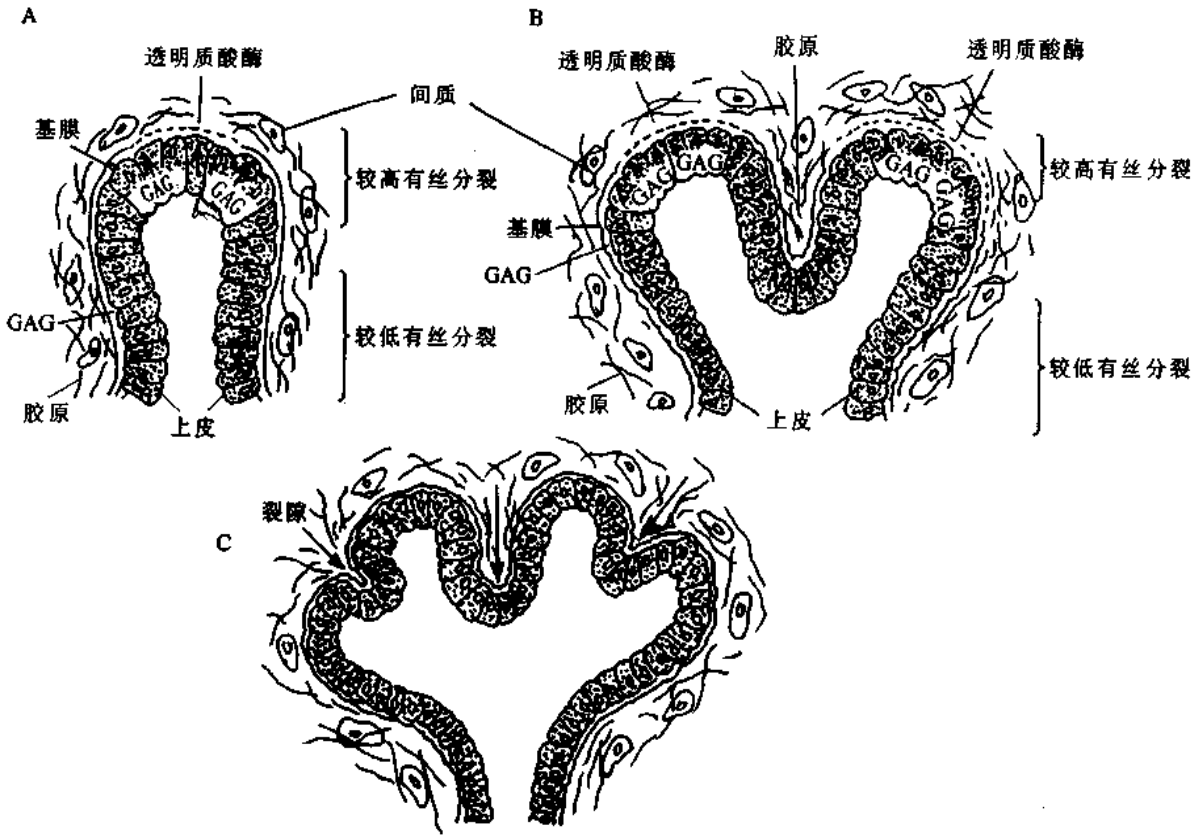


图 9.13　控制唾液腺形态发生的模型

A. 由于间质在顶部区域分泌的透明质酸酶的作用，基板(basal lamina)局部降解，在此处裂隙开始形成　B. 由于胶原在裂隙中沉积，含 GAG 的基板被稳定下来，而基板继续在新的顶部降解，产生另一次分支(C)

第六节　单细胞水平的诱导作用

在诱导的和反应的细胞间的相互作用引起反应细胞发育途径的变化时，产生胚胎诱导。没有诱导作用，反应细胞将变为一种细胞，在诱导作用下它们将变为另一种细胞。通常关于诱导作用的研究和讨论只涉及组织，现代有关果蝇和秀丽新小杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的发育遗传学研究证明，诱导作用实际发生于细胞－细胞的水平。

一、果蝇视网膜的 *sevenless* 和 *bride of sevenless* 基因

果蝇的视网膜是由约 800 个称为小眼(ommatidia)的单位组成的(图 9.14)。每个小眼是由 20 个以精确的模式排列的细胞组成的。眼是在幼虫眼器官芽的扁平上皮层中发育的。在那里没有直接位于此层上方或下方的细胞，所以相互作用限制在相邻的细胞中。随意排列的上皮细胞分化为视网膜的感光细胞和围绕它们的晶状体组织的过程发生于最后(第三)的幼虫期。

一个凹痕首先在器官芽的后部边缘处形成，此后这个沟开始朝上皮的前方延伸。当此沟经过

细胞组成的一个区域时，这些细胞以一种特殊的顺序开始分化。第一个发育的细胞是中央的(R8)感光细胞。(还不知道此沟怎样指令一定的细胞变为 R8 感光细胞)。R8 细胞被认为诱导其上方的和下方的(就沟而言)细胞分别变为 R2 和 R5 感光细胞。R2 和 R5 在功能上是完全相等的，所以从 R8 来的信号可能对这两个细胞是相同的。从这两个细胞来的信号诱导四个较近的细胞变为 R3、R4 和 R1、R6 感光细胞。最后，R7 感光细胞出现(图 9.15)。围绕这些感光细胞的其他细胞将变为晶状体细胞。如果这些细胞未被诱导，就没有晶状体的决定。

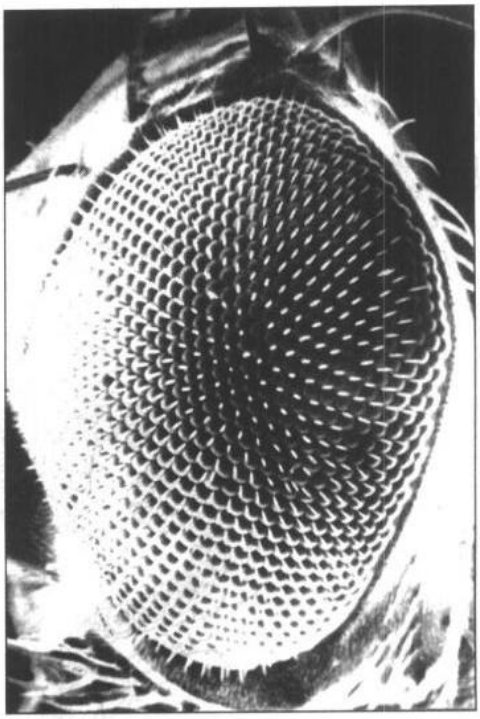


图 9.14 果蝇(*Drosophila*)复眼的扫描电镜照片
每个眼面是一个小眼，从每个小眼伸出一个感觉的刚毛

已发现一系列的突变可阻断这个诱导级联的一些步骤。如 *rough*(*ro*)突变阻断 R3 和 R4 感光细胞的诱导。*sevenless*(*sev*)的突变和 *bride of sevenless*(*boss*)的突变每个都能防止 R7 的分化(将变为晶状体细胞)。这些突变的分析证明它们卷入诱导的过程。*sevenless* 基因为 R7 细胞本身所要求。如果形成的镶嵌型胚胎的眼器官芽的一些细胞是野生型的，而一些细胞是 *sev* 突变的纯合子。那么 R7 感光细胞只有在 R7 的前体细胞(procursor cell)具有野生型 *sevenless* 的等位基因时才能发育。用抗体发现这种蛋白质在细胞膜中，和 *sevenless* 基因的序列分析提示，它是在细胞质区域中具有一个酪氨酸激酶位点的跨膜蛋白质。这与蛋白质作为某信号的一个受体的本质是一致的。使 R7 前体分化为 R7 感光细胞的信号可能直接或间接来自 *boss* 野生型等位基因编码的一种蛋白质。具有 *boss* 突变的果蝇纯合子也不具有 R7 感光细胞。器官芽的一些细胞是野生型的，而另一些是 *boss* 突变纯合子的镶嵌基因的研究证明，野生型的 *boss* 基因在 R7 前体细胞中不是必须的。相反，R7 感光细胞只有在野生型 *boss* 基因 R8 细胞中被表达时才分化。所以，*boss* 基因编码某种蛋白质，它在 R8 细胞中的存在是 R7 细胞分化所必须的。由 *boss* 蛋白质产生的信号可能通过细胞的接触起作用。在一个小眼中一个 R8 细胞的野生型 *boss* 基因将不纠正相邻的小眼中一个突变的 *boss* 等位基因。在果蝇视网膜中细胞－细胞的诱导作用综括如图 9.16 所示。研究结果证明，单个的细胞能诱导另一单个的细胞在特定的组织中产生精确的细胞排列。

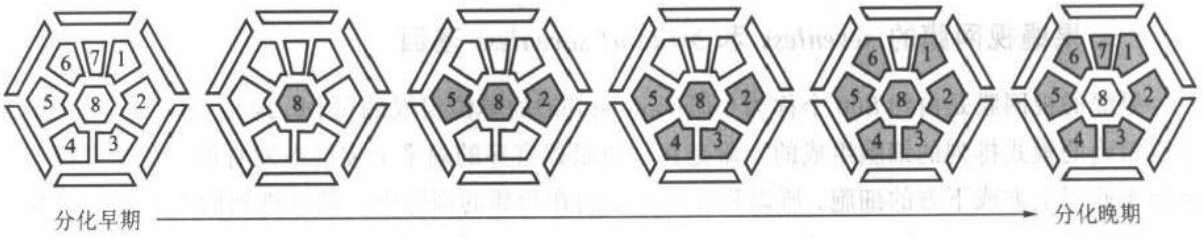


图 9.15 在果蝇晚期幼虫的眼器官芽小眼中感光细胞的分化顺序

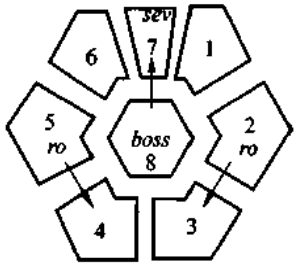


图 9.16　已知涉及果蝇感光细胞诱导作用基因的总结

二、秀丽新小杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)阴门的诱导

在秀丽新小杆线虫阴门的发育中，生殖腺固着细胞(anchor cell)的形成是受编码一个细胞表面受体蛋白质的 *lin - 12* 基因调节的。在野生型雌雄同体胚胎中，两个相邻的细胞 *Z*1.ppp 和 *Z*4.aaa 都具有变为生殖腺固着细胞的潜能。它们以一种引起其中一个变为固着细胞，另一个变为子宫前体的方式相互作用。在隐性的 *lin - 12* 突变体中，两个细胞都变为子宫前体。用基因嵌合体和细胞切除的研究证明，这个决定是在幼虫的第二时期形成的。而且 *lin - 12* 基因只需要在那个注定变为子宫前体的细胞中起作用，预定固着细胞不需要它。有人推测这两个细胞起初都合成子宫分化的信号(还未鉴定出)和 lin - 12 蛋白质的受体。在幼虫发育的一个特定时间，由于某种机会，一个细胞分泌较多的这种分化信号，它引起邻居细胞停止信号分子的产生和增加它的 lin - 12 蛋白质的生产。分泌信号的细胞变为生殖腺的固着细胞，而通过 lin - 12 蛋白质接受信号的细胞变为腹侧的子宫前体细胞。下一步是固着细胞决定 6 个阴门前体细胞(vulval procursor cell)的命运。这种命运主要是由它们靠近固着细胞决定的。固着细胞释放出一种易扩散的分子信号，它以一种依赖位置的方式起作用(图 9.17)。最靠近固着细胞的阴门前体细胞(通常为 P6.p)被给予一个"初级的命运"，并被指令对称地分裂三次，形成阴门细胞。在初级细胞侧部的两个细胞被给予"次级的命运"，被固着细胞指令以不对称的分裂产生将来的阴门细胞。而另外三个潜在的阴门前体不被指令形成阴门细胞。它们的命运是分裂一次产生线虫下胚层的细胞。如果此固着细胞被聚焦的激光束切除，所有六个阴门前体细胞保持未受诱导的状态，形成下胚层。

另外，由初级阴门前体释放的一个次级信号好像是稳定细胞的命运，抑制次级阴门前体重新开始一个次级命运。因此存在初级前体对次级前体的侧面抑制作用(lateral inhibition)。

研究证明，至少有三组基因，无阴门(*vul*)、多阴门(*muv*)和 *lin - 12*，调节阴门的发育。*vul* 缺陷的线虫没有阴门。所有这些突变线虫的阴门前体细胞都获得第三级的细胞命运。相反，缺少 *muv* 基因的动物具有从这六个潜在的阴门前驱细胞的每一个来的阴门。这表明野生型的等位基因抑制细胞产生阴门组织。六个阴门前体细胞最初是具 *muv* 基因的。*muv* 的基因产物被认为抑制 *vol* 基因。在这种情况下，前体细胞不形成阴门细胞，但形成下胚层。然而，来自固着细胞的信号取消 *muv* 的抑制，从而允许那些接受固着细胞信号的细胞中野生型 *vul* 基因起作用。因此，在这一步，固着细胞的信号决定三个细胞将是初级的或次级的阴门前体，而另外三个细胞将产生下胚层。下一步涉及初级和次级阴门前体细胞的区别。这是通过分泌一种激活相邻细胞中的 *lin - 12* 基因信号的初级阴门前体决定的。如果 *lin - 12* 基因在某个细胞中被激活，这个细胞将变为一个次级阴门前体。

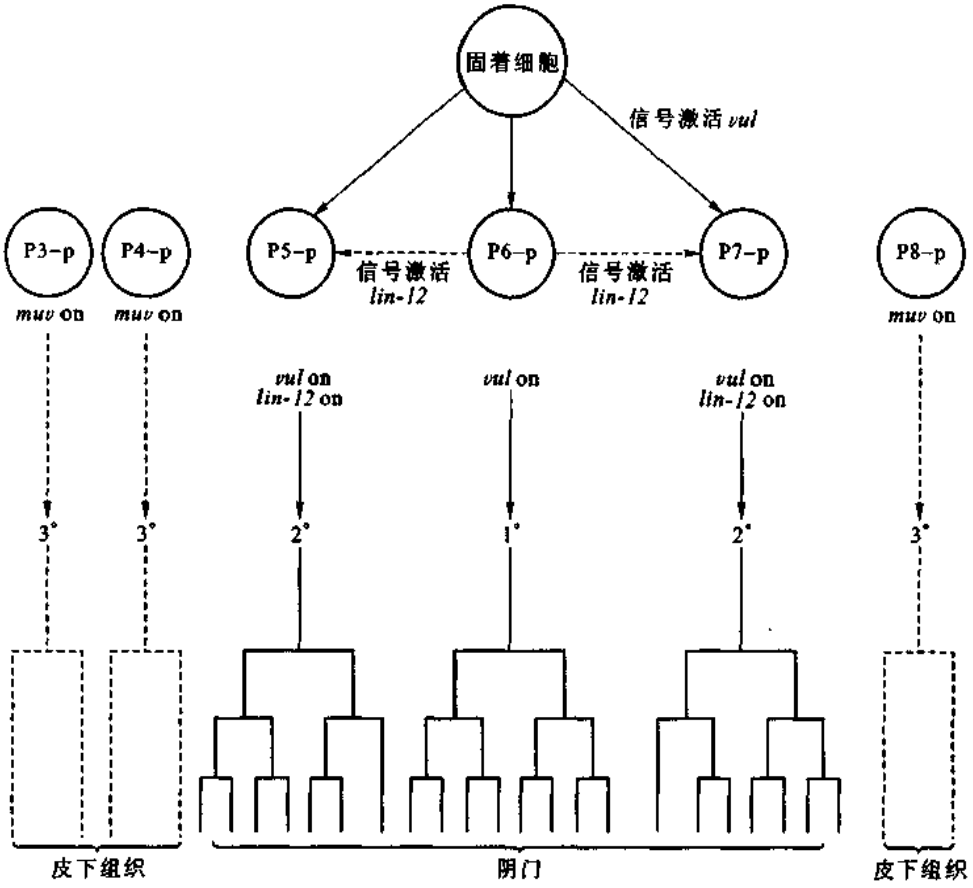


图 9.17 在秀丽线虫中阴门细胞系的决定

固着细胞发出的信号引起六个潜在的前体细胞中的三个细胞的 *Vulvaless* 基因被激活。最靠近固着细胞的前体细胞变为初级阴门前体细胞。另外三个没收到固着细胞刺激的细胞中，*Multivulva* 基因抑制 *Vulvaless* 基因，它们形成下胚层，而不是阴门组织。最靠近固着细胞的前体细胞分泌一种短程信号，它诱导相邻的细胞激活 *lin－12* 基因。这个基因引起它们变为次级阴门前体细胞

在那些缺少 *lin－12* 基因的线虫中，它们的阴门前体细胞将获得或是初级的或是三级的命运，但没有次级阴门前体细胞。因此，两种细胞间相互作用的结合特化了潜在的阴门前体的三种命运。显然，*lin－12* 基因在决定细胞的命运中是至关重要的，而且它好像编码一种受体蛋白质。*lin－12* 基因序列分析证实一组膜蛋白的存在。这种蛋白质的功能是接受来自邻近细胞的分化信号。lin－12蛋白质的序列非常类似于另外两种蛋白质 glp－1 和 Notch 的序列。秀丽新小杆线虫的 glp－1 蛋白质当其种系细胞(germ line cell)没有收到来自生殖腺继续有丝分裂的信号时，该蛋白质在这些细胞中是必须的。Notch 蛋白质是果蝇表皮分化所必须的，缺少这种蛋白质的外胚层细胞将变为成神经细胞。

所有这三种蛋白质都以一段类似于表皮生长因子分子的一部分重复序列片段开始，这个“公开的片段”因此被称为“EGF 样的重复”。此后是三个这些膜蛋白所特有的重复成分。在它们的跨膜部分被切断后，三种蛋白质含有一个非常类似于酵母 cdc－10 蛋白质的区域，这个蛋白质涉及调节细胞分裂。这些蛋白质各自接收它们的形态发生信号并把它们传送到细胞核所用的机制正是当前在研究的。遗传的、分子的和胚胎学研究的结合开始描绘出诱导的一些事件，通过它们对细胞

命运的调节的研究，并由此开始去发现那些涉及诱导过程的一些起决定作用的分子。

参考文献

1 庄孝僡.关于胚胎诱导的几个问题.科学通报，1963，12:22～32

2 Austin J,Kimble J. Transcript analysis of *glp－1* and *lin－12*, homologous genes required for cell interactions during development of *C. elegans*. Cell, 1989, 58:565～571

3 Basler K,Hafen E. Ubiquitous expression of sevenless: Position－dependent specification of cell fate. Science, 1989, 243:931～934

4 Bowtell D D L, Simon M A,Rubin G M. Ommatidia in the developing *Drosophila* eye require and can respond to *sevenless* for only a restricted period. Cell, 1989, 56:931－936

5 Dixon J E, Kintner C R.Cellular contacts required for neural induction in *Xenopus laevis* embryos: evidence for two signals. Development, 1989, 106:749～757

6 Ferguson E C, Sternberg P W. and Horvitz,R. A genetic pathway for the specifi cation of vulval cell lineages of *Caenorhabditis elegans*. Nature, 1990,326:259～267

7 Gilbert S F,Saxén L, Spemann S.Organizer: Models and molecules. Mech.Dev. 1993, 41:73～89

8 Hanburger J B, Hilde Mangold.Codiscoverer of the organizer.J.Hist.Biol.,1984 17:1～11

9 Hill R J,Sternberg P W.The gene *lin－3* encodes an inductive signal for vulval development in *C. elegans*. Nature, 1992,358:470～476

10 Jacobson A G,Sater A K. Features of embronic induction. Development,1988,104:341～359

11 Kollar E J,Fisher C. Tooth induction in chick epithelium: Expression of quiescent genes for enamel synthesis. Science, 1980,207:993～995

12 Pritchard－Jones K, *et al*. The candidate Wilm's tumour gene is involved in genitourinary development. Nature, 1990, 346:194～197

13 Reinke R,Zipursky A L.Cell－cell interaction in the *Drosopila* retina: The bridge of *sevenless* gene is required in photoreceptor cell R8 for R7 cell development. Cell, 1988, 55:321～330

14 Ruizi Altaba A,Melton D A. Involvement of the *Xenopus homeobox* gene *Xhox3* in pattern formation along the anterior－posterior axis. Cell, 1989, 57:317～326

15 Sharpe C R,Gurdon J B. The induction of anterior and posterior neural genes in *Xenopus laevis*. Development, 1990, 109:765－774

16 Sharpe C R, Fritz A, De Robertis E M, *et al*. A homeobox－containing marker of posterior neural differentiation shows the importance of predetermination in neural induction. Cell, 1987, 50:749～758

17 Slack J M W, Issacs H V.The presence of basic fibroblastic growth factor in the early *Xenopus* embryo. Development, 1989, 105:147～153

18 Sternberg P W, Horvitz H R. The combined action of two intercellular signalling pathways specifies three cell fates during vulval induction in *C. elegans*. Cell, 1989, 58:679～693

19 Storey K, Crossley M, De Robertis E, *et al*. Neural induction and regionalisation in the chick embryo. Development, 1992, 114:729～741

20 Vainio S. Jalkanen M, Bernfield M, *et al*. Transient expression of syndecan in mesenchymal cell agregates of the embryonic kidney. Dev. Biol., 1992, 152:221～232

第十章　神经系统的发育

由于神经系统极其复杂和精密的结构及功能，决定了它在胚胎发育中将经历极其精细的构筑过程。其中包括所有神经细胞的发生、增殖(proliferation)过程，这些细胞怎样从它们发生的地点到达其最后定居位置的迁移(migration)过程，以及在上述过程中这些细胞将怎样进行分化的决定(determination)。以上是神经系统组织发生的核心。最后，神经系统功能的建立还要依赖于神经元之间及其与靶组织之间相互作用形成精密的连接。

第一节　神经系统的组织发生

一、神经系统的形态发生

从胚胎发育的观点看，神经系统的主要组成成分来源于神经胚的三个部分：神经管、神经嵴和外胚层板。神经管和神经嵴在形态发生中是神经胚形成中一个过程的两个产物。外胚层板是由胚胎头部特定区域的外胚层增厚单独形成的。

二、神经管细胞的增殖、迁移和分化

1．神经管细胞的增殖和迁移

(1) 神经管细胞的增殖

神经管形成后，其柱状上皮变为假复层上皮，此时称为神经上皮(neuro epithelium)或增殖上皮(germinal epithelium)。所有神经上皮的细胞以基底面附着于神经管管腔，进行有丝分裂的细胞均发现于近管腔处。放射自显影的研究发现，神经上皮的细胞有丝分裂周期有一个在神经管壁内往返迁移的过程(图 10.1)。在用^{3}H－腺苷酸标记胚胎后不同时间制备的放射自显影照片中发现，分裂期(M)的细胞紧靠管内壁，分裂后的细胞离开管壁向外移动，同时向内、外两侧伸出细胞质突起，此为 G_1期。随着细胞逐渐移向神经管壁外表面，细胞进入 S 期，此时为 DNA 合成期，标记的^{3}H－腺苷酸在这时掺入到细胞内。此后细胞又逐渐向内移动，在接近管壁时进入 G_2期。当靠近管壁时，向外的细胞质突起缩回，细胞重又进入 M 期。细胞分裂后又向外移动，开始下一个细胞周期。随着有丝分裂过程的进行，细胞有规律地迁移，细胞大量地增殖。这个过程直到细胞终止增殖并开始它们的迁移为止。因为标记的放射物质的活性每经一次有丝分裂后减少一半，所以能够计算出每次细胞周期所用的时间(图 10.2)。通常，发育早期细胞周期较短，发育晚期细胞周期较长，这说明随着发育的进行，细胞增殖的速度逐渐减慢。

(2) 神经管细胞的迁移

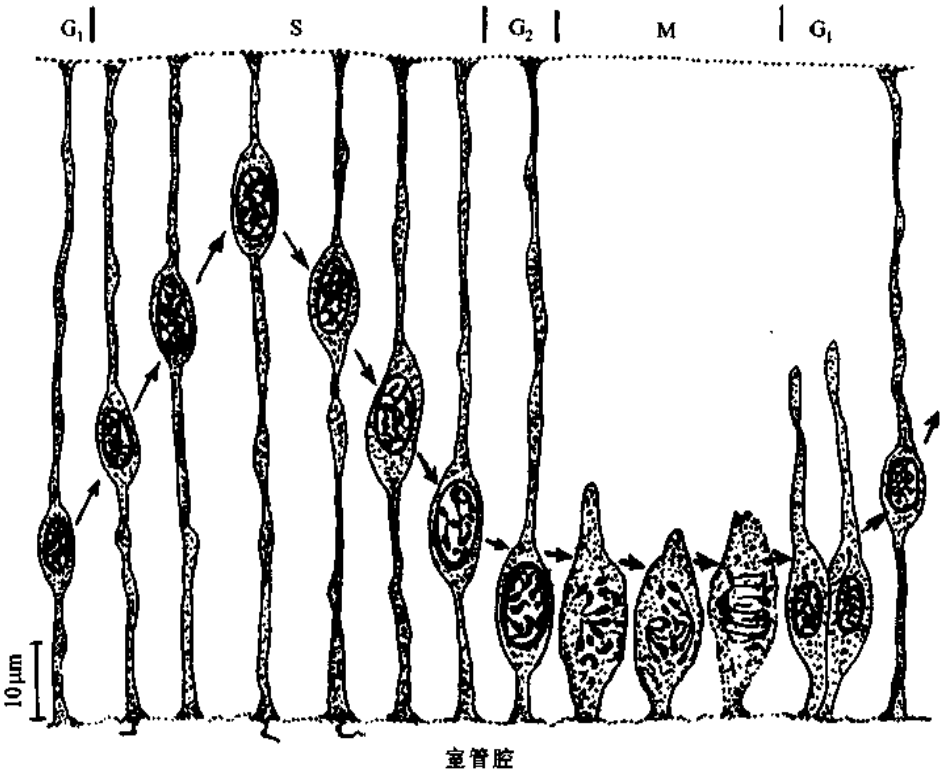


图 10.1　神经管中的细胞周期

在细胞周期中，发现增殖神经上皮细胞核的迁移。在有丝分裂前晚 S 期，细胞核移向管腔壁。细胞伸向外围的突起缩回，并开始细胞分裂。分裂后远侧的突起重新伸出，新的细胞周期又开始

在细胞经历了最后一次有丝分裂之后便停止 DNA 的合成，停滞于细胞周期的 G_1 期。有丝分裂后的细胞开始分化并向基板迁移(图 10.3)。由于细胞的聚集，形成外套层(mantle layer)。随着停止分裂后的细胞不断加入，外套层逐渐增厚。在外套层和基板之间是边缘层(marginal zone)，它起初含有神经上皮细胞基部的突起，后来外套层中神经细胞的突起和神经系统其他部分细胞长入的突起也侵入到此层。随着外套层中细胞的分化，产生的轴突(axon)和树突 (dentrite) 形成一个中间层(intermediate layer)。当神经管分化为脊髓后，此层增厚。外套层含有细胞体，组织学染色较深，通常被称为灰质(grey matter)，而含轴突和树突的边缘层不容易着色，通常呈白色，因此被称为白质(white matter)。

在神经系统层状结构的发育中，神经细胞好像是沿着神经胶质细胞伸出的、辐射状排列的突起迁移的。这些突起被称为辐射纤维(radial fiber)，它们从室管层伸向软脑膜表面。电镜研究发现，在大脑皮层中神经细胞的迁移一直紧紧地贴附于辐射状排列的神经胶质细胞的突起上(图 10.4)。在小脑皮层中，神经细胞是沿着伯格曼胶质细胞迁移的。在某些小鼠的突变体中，颗粒细胞和伯格曼神经胶质细胞之间的联系是异常的，因而颗粒细胞的迁移被严重地干扰。这一证据表明，迁移的神经细胞和神经胶质细胞的辐射状突起之间并不是一种简单靠近的关系。

2. 神经细胞的分化

(1) 神经细胞的分化

作为神经管衬里的室管膜细胞(ependymal cell)能产生神经元和神经胶质细胞的前体。有人认

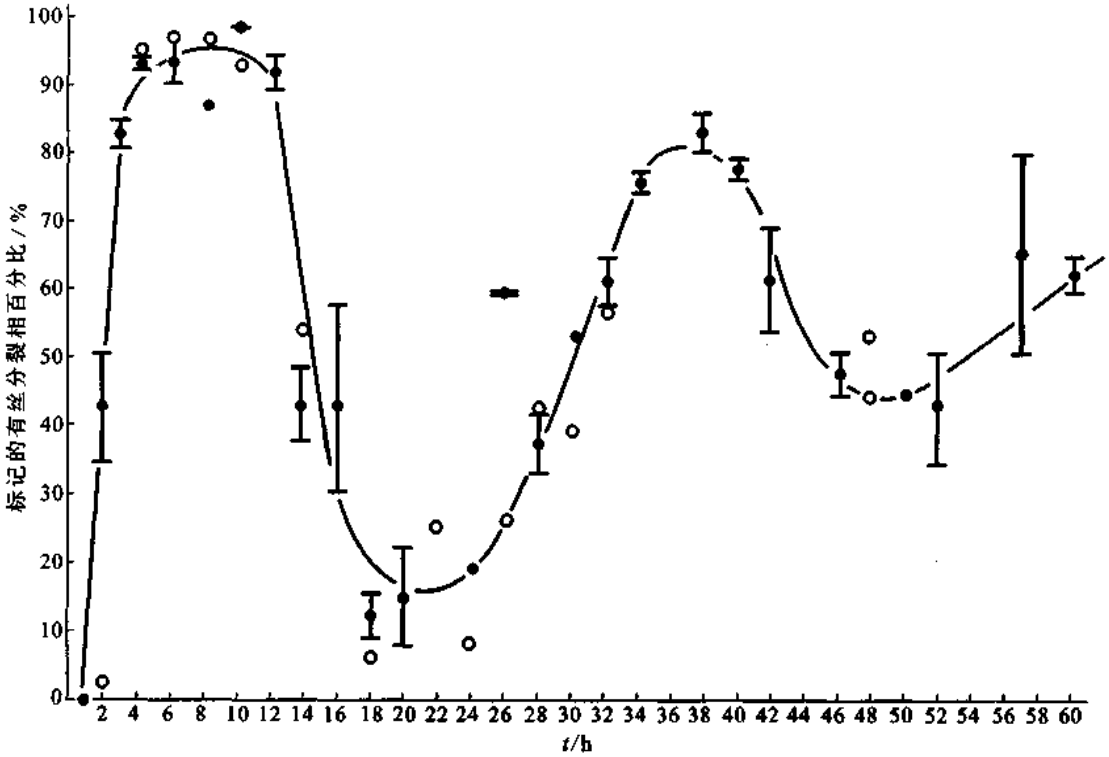


图 10.2　确定细胞周期持续的时间

图示注射^{3}H－腺苷酸后不同时间在视网膜中标记的有丝分裂相的百分数。注射后所有的有丝分裂相被标记，因为在有丝分裂前这些细胞中发生 DNA 的合成。两次峰之间的时间就是细胞周期持续的时间

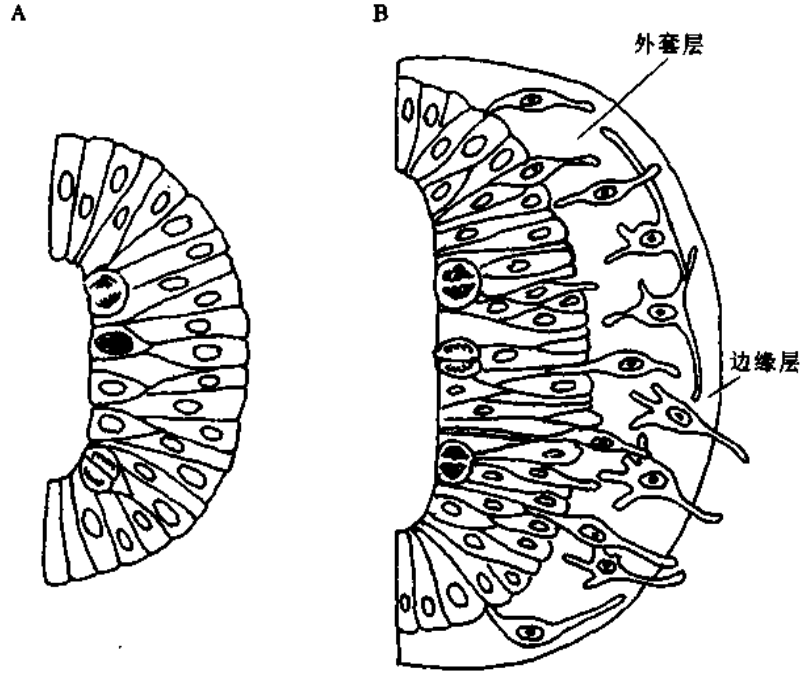


图 10.3　中枢神经系统发育的两个时期(仿 Balinsky,1981)

A. 神经管最初是一种假复层上皮，其中的细胞正活跃地分裂　　B. 细胞停止所有的有丝分裂活动后，从管腔表面脱离，迁移到外套层。此后这些细胞产生轴突，轴突被包以髓鞘，因而产生第三层，即边缘层

为，这些前体细胞的分化是由它们进入的环境决定的。虽然神经上皮细胞将来能分化为神经细胞和神经胶质细胞，但是还不知道这两种细胞是在何时被决定的。许多研究者赞成下述观点：当细胞处于外套层中时，成神经胶质细胞与幼稚的神经元之间没有明显的形态学差别。然而，当细胞开始迁移时，将来的神经元不再具有细胞分裂的能力，而神经胶质细胞有此能力，并在有机体整个一生中都能持续进行分裂。虽然细胞的类型直到分化后才能从形态学上区别，但最近用神经胶质细胞特异的分子标记物——神经胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein，GFAP)进行的免疫细胞化学研究表明，在室管膜中的某些细胞表达 GFAP，而另一些不表达。推测前者为神经胶质细胞，后者为成神经细胞。这一结果提示，在室管膜中的神经胶质细胞在其迁移前就已决定了。

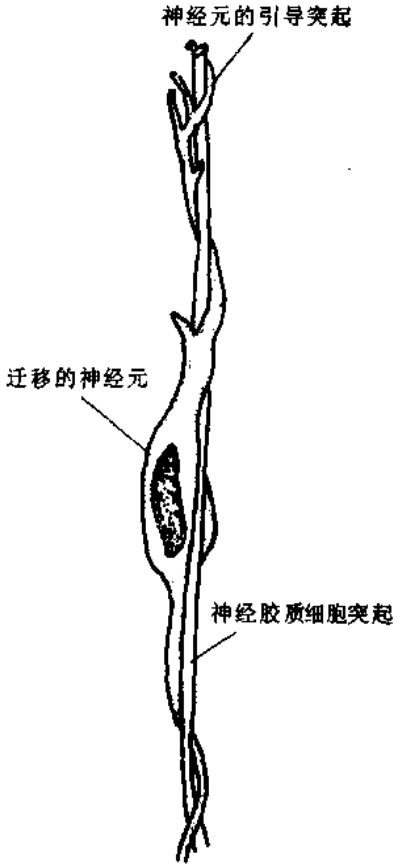


图 10.4　大脑皮层中迁移的双极细胞与神经胶质细胞辐射状突起之间的关系

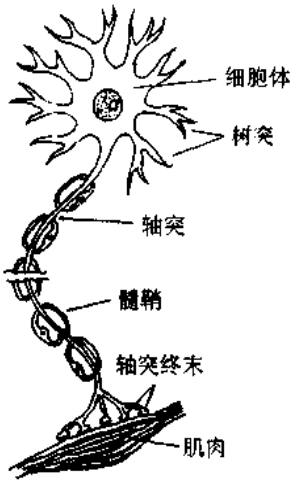


图 10.5　图示一个运动神经元的细胞体、轴突和树突

(2) 神经细胞的结构和分类

神经系统是由神经元和神经胶质细胞组成的。人脑是由超过 10^{11} 个神经元以及与其相连的超过 10^{12} 个神经胶质细胞组成。神经元被认为是动物体内功能最特异和形态结构最复杂的细胞，它除具真核细胞结构的一般特性外，还独具特点：如一些神经元只发育出少数特化的区域，用于传递电冲动；而另一些神经元产生广泛的特化区域用于细胞间的通讯。神经元用于接收电冲动的细延长部分称为树突(dendrite；图 10.5)。通常树突的数目较多，一般伸出的长度较短而且具有分支。神经元另一个重要的特征是具有一个较长的轴突(axon)，轴突仅在末端具有终

末分支(terminal),它将神经冲动由细胞体传出。神经元的树突或轴突以一种非常独特的突触(synapse)方式与其他细胞相连接。根据轴突和树突数目的不同,可将神经元分为:①双极神经元(bipolar neuron),具有一个轴突和一个树突,如视网膜中的双极细胞;②多极神经元(multipolar neurons),具有一个轴突和几个树突,大多数神经元属于这一类;③假单极神经元(pseudounipolar neuron),具有一个较短的突起,末端分支为 T 形较长的突起。T 分支的一端接收感觉的刺激和产生神经冲动,为树突;另一端将神经冲动传入到大脑或脊髓,为轴突。感觉神经元属于这种类型。

神经元能将电冲动从一个区域传递到另一个区域。其传递方向通常是从树突到细胞体,然后再集中到轴突,并由轴突向下一个神经元传递。为了防止电信号的分散和保障传递速度,在中枢神经系统中的轴突被称为少突胶质细胞(aligodendrocyte)的突起隔离开。在发育过程中,通常一个少突胶质细胞围绕包裹发育中的轴突,产生一个富含髓磷脂碱蛋白、螺旋盘绕着中央轴突的特化细胞膜复合体,称之为髓鞘(meylin sheath;图 10.6)。在周围神经

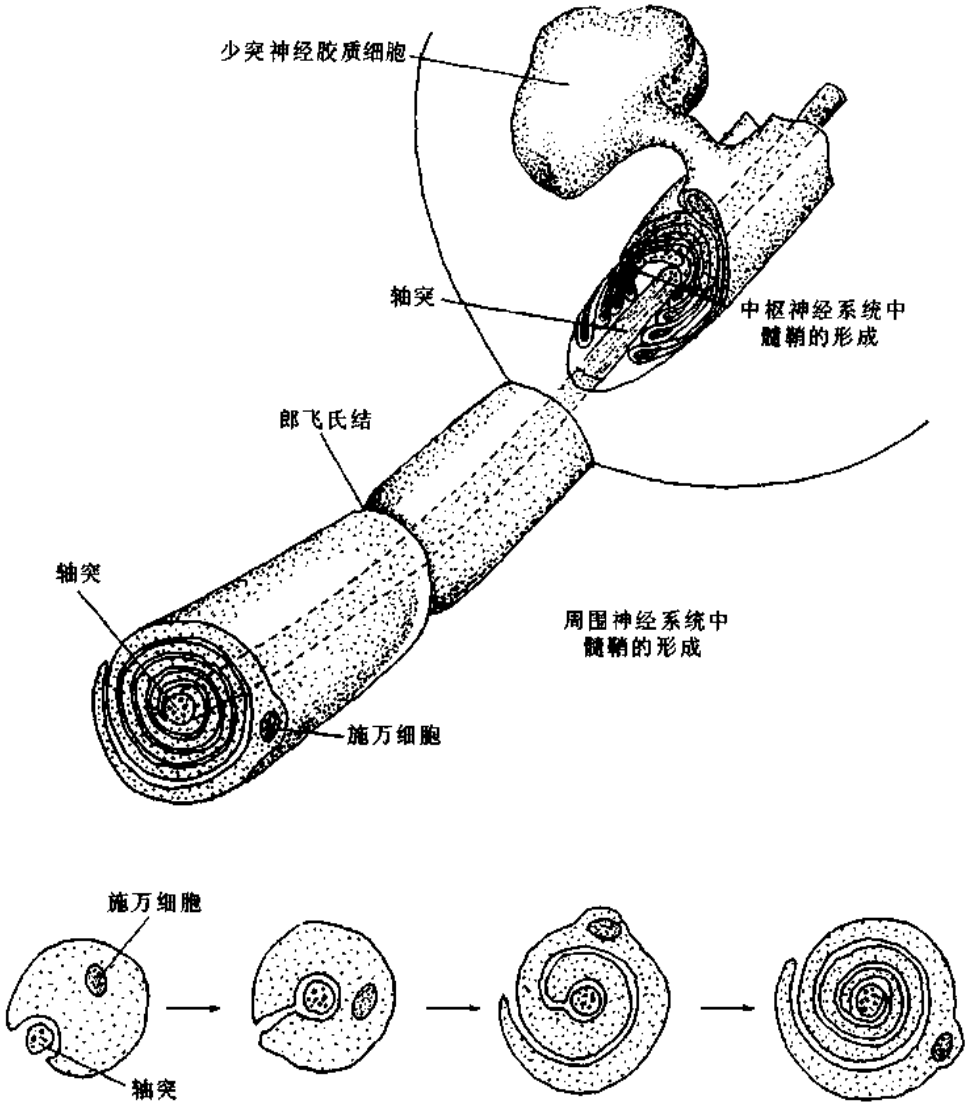


图 10.6 中枢和周围神经系统中髓鞘的形成

在周围神经系统中,施万细胞围绕轴突包裹;在中枢神经系统中,少突胶质细胞的突起形成髓鞘(上图)。这种包裹产生多层膜的复合体(下图)

系统中，髓鞘是由称为施万细胞(Schwann cell)的胶质细胞形成的。每个施万细胞只包围一根轴突，而每个少突胶质细胞可以同时包围几根轴突。

轴突还必须合成和分泌特殊的神经递质(neurotransmitter)，把特定的电信号传递到其靶细胞。一些神经元能合成和分泌乙酰胆碱；而另一些神经元合成肾上腺素、去甲肾上腺素、真鞘胺、5－羟色胺、γ－氨基丁酸、多巴胺或其他神经递质。在发育过程中，每个神经元必须激活那些负责合成自己神经递质的酶的基因。因此，神经元的发育包括结构和分子的分化。根据神经元合成和利用的神经递质的不同，又可将神经元分为乙酰胆碱能的(cholinergic)、肾上腺素能的(adrenergic)等等。

另外，还可根据神经元执行的功能分类。根据传导冲动的方向，将神经冲动由感受器传导到中枢神经系统的称为感觉(sensory)神经元或传入(afferent)神经元；将神经冲动由中枢神经系统传导至效应器(肌肉或腺体)的称为运动(motor)神经元或传出(efferent)神经元。还有一类神经元称为联合(association)神经元或中间神经元(interneuron)，它们位于中枢神经系统内，起联系和整合神经系统功能的作用。

3．中枢神经系统的组织分化

在神经管中看到的增殖、迁移和分化的基本模式，在神经系统其他部分的发育中有所调整。通常，形成层状结构(大脑皮层、原始皮质和小脑)时，显示出一种基本类似的组织发生模式，但是次级增殖带在不同区域中具有某些独特的变异。非层状结构显示出一种稍微不同的发生模式。现以大脑皮层和小脑皮层的组织发生为例说明层状结构发育的过程和与非层状结构在组织发生上的不同。

(1) 大脑皮层的组织发生

大脑皮层(cerebral cortex)的细胞产生于类似神经管中神经上皮的室层(ventricular zone)(图10.7)。室层最先出现，由它产生其他各层的细胞。它在发育的早期阶段分化为室管膜层(ependymal layer)，由于细胞的增殖外扩，在邻近形成亚室管膜层(subependymal zone)，其中也含增殖的细胞。由于停止有丝分裂的细胞向外迁移，形成另外两层：外套层和边缘层，它们类似于神经管中相同名称的层。在外套层中的一些成神经细胞(neuroblast)沿神经胶质细胞向边缘带迁移，产生一个次级的神经元带，成为中间层，内含正在分化的神经元和神经胶质细胞。最早完成分裂外迁的成神经细胞到达边缘层下面形成皮层板(cortical plate)，它将来发育为新皮层(neopallial cortex)。该皮层最后分化为含细胞体的6层，由外向内分别是：Ⅰ分子层、Ⅱ外颗粒层、Ⅲ锥体细胞层、Ⅳ内颗粒层、Ⅴ神经节细胞层和Ⅵ多形细胞层。用放射性同位素自显影技术对大鼠进行的研究表明，除分子层是由最早到达皮层板的 Cajal－Retzius 细胞形成之外，其余5层皮层组织发生的主要特点是神经元迁移由内至外的组装过程(图10.8)：在发育早期(妊娠16天)结束最后一次有丝分裂的细胞迁移形成较深的皮层(Ⅵ)，较晚期完成分裂的细胞逐渐向外迁移，靠近表面依次形成Ⅴ(妊娠17天)、Ⅳ(妊娠18天)、Ⅲ(妊娠19天)、Ⅱ层(妊娠21天)(图10.9)，呈一种“堆积”模式，即较晚期迁移的细胞堆积于那些较早期细胞的外面。这种“内－外”组装模式意味着较晚期形成的细胞通过已定位的神经元迁移。这个事实可能对了解皮层内连接的形成具有重要的意义。皮层内回路(circuity)具有柱状组织的特点，在皮层中可以通过不同层间的连接进行通讯。皮层内连接的决定可能部分地受迁移期间神经元之间相互作用的影响。

(2) 小脑皮层的组织发生

小脑皮层(cerebellar cortex)显示出一种与大脑皮层稍微不同的组织发生模式。小脑皮层的早期分化像大脑皮层一样(图10.7)。在第四脑室顶部的室层首先产生主要的神经元——浦肯野细胞(Purkinje cell)，然后是小脑皮层的其他较大的中间神经元和一些神经胶质细胞。这些细胞迁移

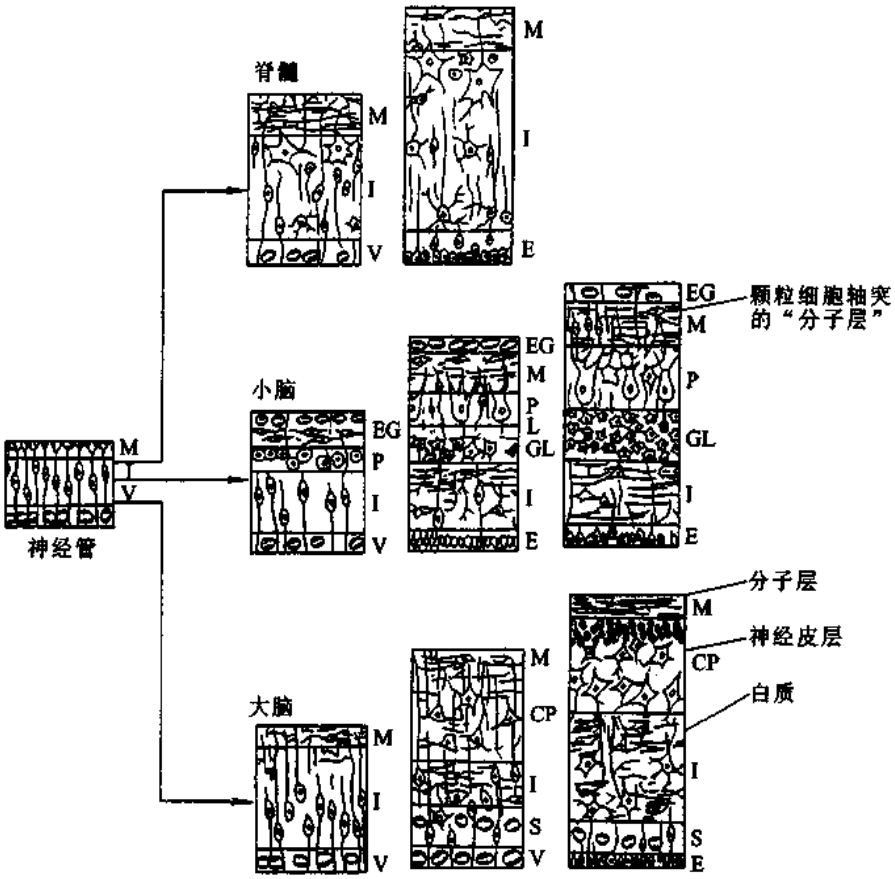


图 10.7　脊髓,小脑和大脑皮层中室层、中间层和边缘层的分化

由左向右表示逐渐到发育的晚期。

V. 室层　I. 中间层　M. 边缘层　P. 浦肯野细胞层　EG. 外颗粒层　L. 分离板　GL. 颗粒层　CP. 皮层板　E. 室管膜　S. 亚室管膜

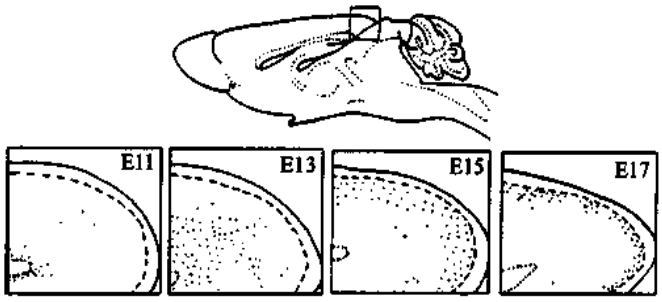


图 10.8　小鼠大脑皮层中神经元起源时间的“内－外”顺序

到边缘层内形成中间层并开始分化，形成一个类似大脑皮层板的小脑板(cerebellar plate)。最后，一些仍然具有分裂能力的成神经细胞群体从第四脑室壁的增生层——菱唇(rhombic lip)迁移到直接位于软膜下的区域，形成一个次级增生层——外颗粒层(external granule layer)。外颗粒层中的细胞在小脑组织发生期间继续分裂一段时间，在经过最后的有丝分裂后，外颗粒层中的细胞通过发育中的小脑皮层，经过浦肯野细胞层，再向内移动到它们在内颗粒层(internal granule layer)的

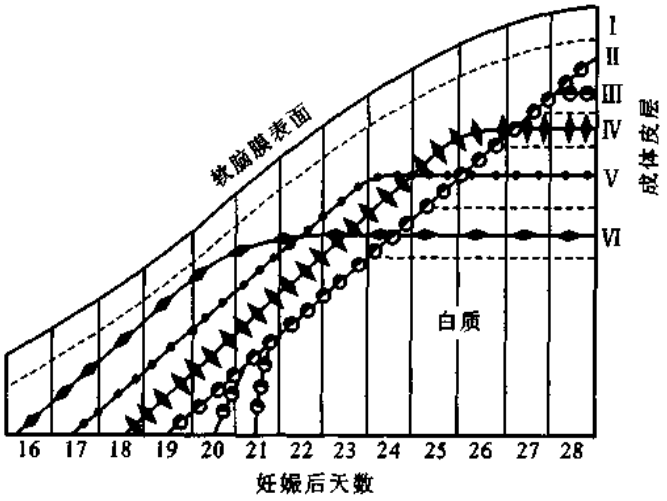


图 10.9　在大鼠妊娠 16,17,18 和 19～21 天用^{3}H－胸腺核苷标记后显示大脑皮层中神经元的迁移模式和起源时间

最终位置。因此颗粒细胞(包括海马的颗粒细胞)是脊椎动物小脑中最后形成的神经元。在人类，外颗粒层直到出生后大约 600 天才消失。当外颗粒层的神经细胞通过分子层(molecular layer)时，在不同的时间呈现不同的分化形态(图 10.10)。当到达分子层时，从细胞体的一侧产生较长的轴突，发育为平行纤维。平行纤维呈 T 形分叉，其一端伸向浦肯野细胞层，颗粒层的神经元就是沿着这条突起移动到内颗粒层。外颗粒层也产生星形细胞(stellate cell) 和篮状细胞(basket cell)，它们仅迁移到小脑的分子层。星形细胞和篮状细胞的进一步迁移受阻，据推测是因为这些细胞产生与平行纤维垂直的突起。最后小脑分化为三层，由外向内分别是分子层、浦肯野细胞层和颗粒层。

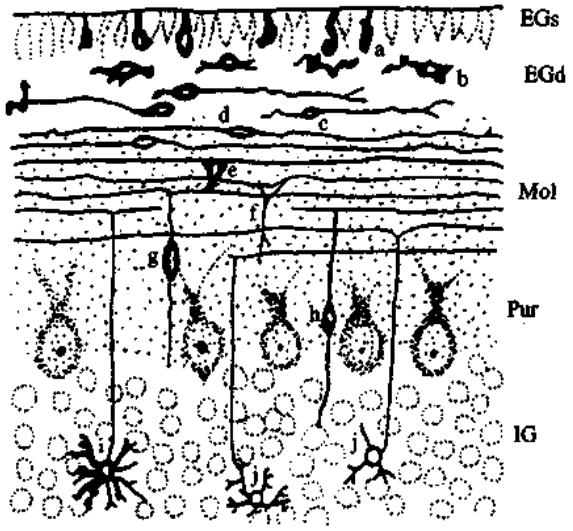


图 10.10　哺乳动物小脑中的颗粒细胞(自 Jacobson,1978)

a～j. 从表面的外颗粒层(EGs)到较深的外颗粒层(Egd)，通过分子层(Mol)和浦肯野细胞层(Pur)到达内颗粒层(IG)的迁移和分化的情形

(3) 非层状结构中的组织发生

在脑的非层状结构(核团)的组织发生中，在靠近脑室较深的层中，成神经细胞聚集成团，称为核团(nucleus)，每个核团是一个功能单位。它与层状结构组织发生的主要不同在于核团的形成表现出一种"外－内"的细胞组装模式，即后形成的细胞并不通过先形成的细胞迁移。这种形成模式被称为"包裹"。有丝分裂后的细胞因从室膜迁移的路线不同形成不同的核团。一些核团是从一个次级增生带迁移来的细胞形成的。例如，脑干中不同核团的一些神经元来自菱唇的次级增生带。

4. 周围神经系统的发育

中枢神经系统由脑和脊髓组成，而周围神经系统包括除中枢神经系统以外的所有神经组织。周围神经系统调节身体所有组织与中枢神经系统的通讯，而中枢神经系统综合整个有机体的活动。

中枢神经系统和周围神经系统可以分为两个主要的组成部分：自主神经系统(autonomic nervous system)和体神经系统(somatic nervous system)(图 10.11)。自主神经系统包括神经支配到内脏器官和各种腺体的平滑肌上的运动神经纤维，因此也称内脏神经系统(visceral nervous system)。此系统控制心脏、内脏器官、汗腺、眼肌和发囊的功能。因为由自主神经系统控制的这些功能是在意识水平下调节的，所以被认为是非随意的控制。自主神经系统又进一步分为交感(sympathetic)和副交感(parasympathetic)神经系统，它们通常在同一器官上起拮抗作用。如神经支配心脏的交感神经增加心跳，而副交感神经却降低心率。体神经系统包括神经支配和控制骨骼肌的神经元，这个系统是随意的控制。

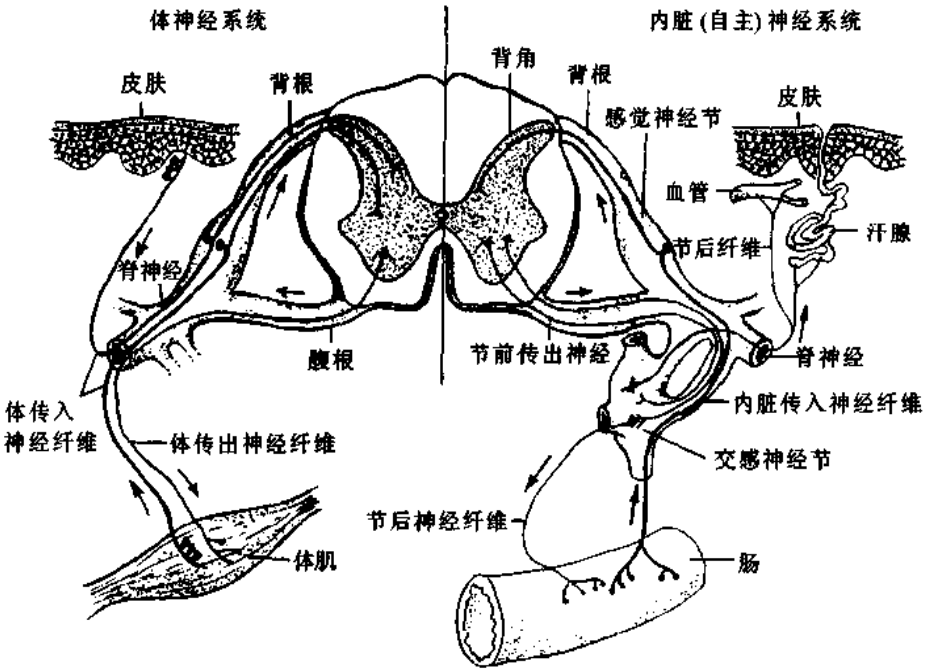


图 10.11 图示周围神经系统中体神经系统和自主神经系统的各种成分

自主神经系统和体神经系统二者都含两种类型的神经元：感觉或传入神经元和运动或传出神经元(图 10.11)。感觉纤维携带从周围环境得到的感觉，如痛觉、触觉和自体感觉，从背侧进入脊

髓并与灰质中的神经元形成突触。这些感觉神经元的细胞体位于脊髓之外并聚集成神经节(ganglion)的结构。因为感觉神经突起通过背根神经(dorsal root nerve)进入脊髓,所以其神经节称为背根或感觉神经节(sensory ganglion)。感觉神经节沿脊髓长度呈周期性排列(图 10.12)。感觉神经从周围获得的信息在中枢神经系统内通过复杂的途径整合,加工后的信息再向外传递到肌肉或腺体。这些信息是通过运动或传出神经元传递的。在体神经系统中运动神经元的细胞体位于脊髓腹部的灰质中,其纤维伸出脊髓形成脊神经的腹根(见图 10.11、10.12)。这些纤维直接在相应的横纹肌上形成突触。自主神经系统的运动神经比较复杂,其神经支配要求两种神经元的连续连接。第一种神经元的细胞体位于神经管腹部,通过背根伸出,并在第二种神经元的细胞体上形成突触;后者在平滑肌或腺体上形成突触。第二种神经元的细胞体也形成神经节。因此,起源于神经管的第一类神经纤维称为节前神经纤维(preganglionic fiber),第二类称为节后神经纤维(postganglionic fiber)。

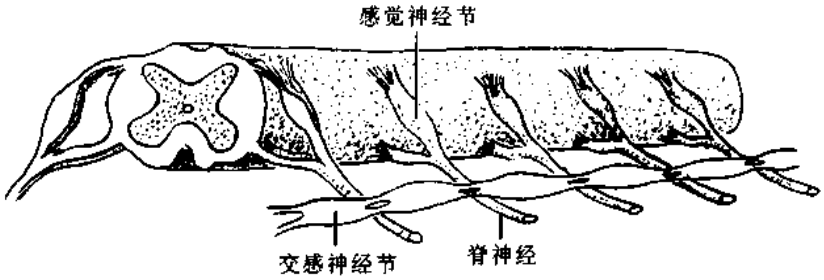


图 10.12　躯干部神经管的表面观
示感觉神经节和交感神经节及脊神经的关系

交感神经系统的节前纤维由脊髓产生,它们与体神经系统的感觉纤维和运动纤维形成脊神经(spinal nerve)。副交感神经系统的节前纤维一般来自脑干,它们与那里的感觉纤维和运动纤维一起形成脑神经(cranial nerve)。

自主神经系统的神经节因其功能不同而处于不同的位置。作为自主交感神经系统的神经纤维,其细胞体集中靠近脊髓的神经节中,称为交感神经节(sympathetic ganglion),它们沿脊髓旁边形成链状,并与感觉神经节相间排列。形成副交感自主神经系统的神经节靠近或位于其支配的器官中,如睫状体神经节(ciliary ganglion)位于眼后部靠近虹膜和睫状肌的地方。

周围神经系统也是由神经元和神经胶质细胞组成,它们来源于中枢神经系统、神经嵴和外胚层板。从周围神经系统的组成上可以看出其发育比中枢神经系统的复杂得多,在此不再详述。

三、神经嵴及其衍生物

由神经嵴产生的各种细胞从神经管背侧迁移到它们最后定居的地点。已知神经嵴细胞能产生大量不同类型的细胞,包括感觉神经系统的神经元,交感和副交感神经系统的神经元和神经胶质细胞,肾上腺中产生肾上腺素的髓质细胞,表皮中含黑色素的细胞,以及头部的骨骼和结缔组织成分(表 10.1)。现在还不完全清楚这些细胞是以怎样特定的方式决定分化的,好象这种决定是在发育的很早时期,并与它们迁移的路线和最后定居点的环境相关。

交感和副交感神经系统的神经元的神经递质是不同的。大多数交感神经节细胞是肾上腺素能的，而副交感神经节细胞是乙酰胆碱能的。这两种类型的细胞均起源于神经嵴，而且都是神经元谱系，但是它们的迁移路线和最后定居点是不同的。因此，问题的关键是神经递质的选择是否是在迁移以前决定的，或者是由迁移路线决定的，或是由神经元将要定居的局部组织环境决定的。

表 10.1 神经嵴的一些主要衍生物

	躯干部神经嵴(包括颈部神经嵴)的衍生物	后部神经嵴一些小的、发育晚的衍生物
色素细胞	黑色素细胞，黄色素细胞(红色素细胞)，虹色素细胞(无色细胞)	
感觉神经系统	脊神经节，产生迷走神经(X)根部的神经节	神经胶质细胞(少突胶质细胞)，施万细胞，三叉神经(Ⅴ)，面神经(Ⅶ)根，舌咽神经(Ⅸ)根(上神经节)，迷走神经(X)根(颈神经节)，支持细胞
自主神经系统	交感神经系统：上颈神经节，椎前神经节，椎旁神经节，肾上腺髓质 副交感神经系统：Remak 氏神经节，腰丛，腮和肠的神经节	副交感神经节，睫状体、筛骨、蝶骨和颌下腺的内脏神经节
骨骼和结缔组织	两栖类背鳍的间充质，主动脉弓的壁，甲状旁腺的结缔组织	大多数内脏的软骨，心的肉柱(产生后小梁，基板和甲状旁腺)，软骨细胞，成牙质细胞，头部间质(膜骨)
内分泌	肾上腺髓质，颈动脉体的Ⅰ型细胞，甲状腺的滤泡旁细胞(产生降钙素)	

一系列实验证明了局部组织环境对神经嵴衍生物的决定作用。实验是用鸡和鹌鹑的胚胎作材料，从二者取得的神经嵴细胞可以根据细胞核核仁的大小和染色性质的不同区分开。在鸡和鹌鹑中肠的类乙酰胆碱能的副交感神经节起源于迷走区(vagal region，前 7 个体节)的神经嵴，而类肾上腺素能的交感神经节的神经元起源于躯干部的神经嵴。两种类型的神经元起源于神经嵴的不同部位和通过不同的路线迁移。当将鹌鹑产生交感神经元的躯干部神经嵴移植到鸡的迷走区时，被移植的神经嵴通过迷走区神经嵴特定的迁移路线到达目的地，产生乙酰胆碱能的副交感神经节(图 10.13)。这样，本来应产生交感(肾上腺素能的)神经节的神经嵴，形成了副交感(乙酰胆碱能的)神经节。相反，当取自鹌鹑迷走区的神经嵴被移植到鸡胚的躯干部时，被移植的神经嵴产生肾上腺素能的交感神经节。

以后的研究发现，某些因子能影响神经嵴衍生物对神经递质的选择。例如，将晚期胚胎的交感神经元体外培养几周时，它们表达的递质是由培养条件决定的。如果交感神经元生长于培养过心脏的培养基(心脏条件培养液)中时，这些神经元失去了类肾上腺素能的性质，并开始合成乙酰胆碱。如果与心脏组织共同培养极少数(有时甚至是单个的)神经节细胞，用电生理学方法证明，在心脏细胞影响下个别神经元经历了一个两种神经递质都释放的阶段，启动了从类肾上腺素能到乙酰胆碱能的转变。现已从培养的心脏细胞中分离出一种 45 kDa 的蛋白质，它能诱导大鼠交感神经元从类肾上腺素能转变为乙酰胆碱能。以上研究结果表明，起源于神经嵴的神经元的分化取决于细胞完成迁移后定居的组织环境。

1. 神经嵴细胞的迁移

在神经胚形成期间，神经嵴是一种短暂的结构，它的细胞在神经管闭合前后就开始分散迁移。

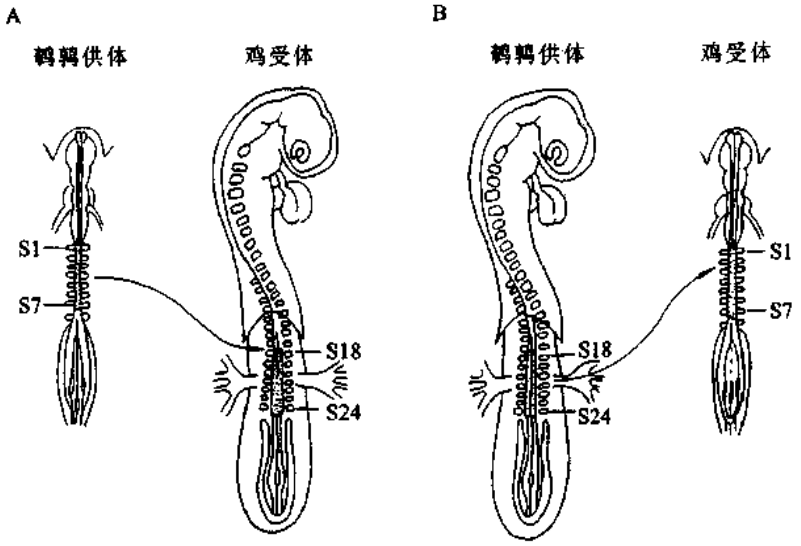


图 10.13　在神经管的迷走区(1～7 体节)和躯干部(18～24 体节)之间异位的移植实验

A. 鹌鹑胚胎迷走区的一片神经管在神经嵴细胞将要迁移前被切除,并移植到鸡胚 18～24 体节的躯干部　B. 相反的移植。实验证实,源于神经嵴细胞的表现型取决于它们迁移所经过的环境

用放射性标记、遗传性标记及特异荧光抗体标记等技术,将一个胚胎的神经管及其相连的神经嵴移植到另一个胚胎中,可以追踪某一区域中个别神经嵴细胞的迁移途径。

(1) 躯干部神经嵴细胞的迁移途径

几个实验室的研究工作证明,躯干部的神经嵴细胞主要迁移路线有两条(图10.14)。第一条

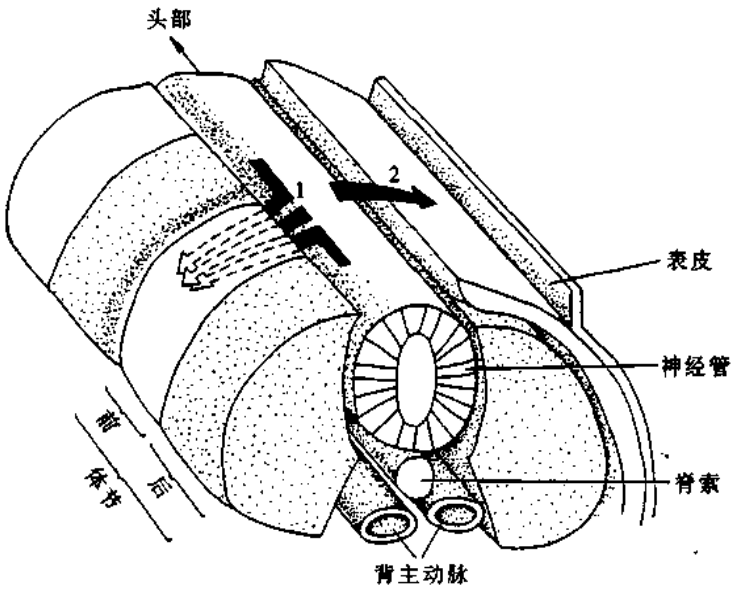


图 10.14　鸡胚躯干部神经嵴细胞的迁移路线

路线 1:细胞通过体节前部向腹侧迁移。相邻体节后半部的细胞从神经管上面向邻近体节的前半部集中,与那里的细胞一起向腹侧迁移。这些神经嵴细胞产生交感和副交感神经节、肾上腺髓质细胞和背根神经节　路线 2:细胞在外胚层下面采取背侧的路线,它们分化为色素细胞

路线是腹侧途径(ventral pathway),通过体节的前部向腹侧伸展。沿这条路线迁移的神经嵴细胞分化为感觉神经元、交感神经元、肾上腺髓质细胞和施万细胞。其中一些细胞到达背主动脉,在那里形成交感神经节(sympathetic ganglia)。在躯干部特定区域中,沿同一路线到达的神经嵴细胞聚集并形成肾上腺髓质(adrenal medulla)中分泌肾上腺素的细胞。用抗体和遗传标记结合的方法证明,与体节后部相邻的那些神经嵴细胞沿神经管向前或向后移动到它们所在的或相邻的体节的前部,与原来位于体节前部的神经嵴细胞结合在一起,形成相同的结构。因此,每个背根神经节是由三个神经嵴细胞群组成的:一个来自体节前部,另两个来自每对相邻体节的后部。第二条路线为背侧部途径(dorsolateralpathway),它从胚胎的外胚层下面穿过,从中央背区移动到皮肤的最腹部。沿这条途径迁移的神经嵴细胞变为色素细胞。如果将一个有色素品系的鸡胚的神经管和神经嵴移植到另一个白化体鸡胚的神经管处,结果产生一只具有杂色羽毛的白鸡。

(2) 头部神经嵴细胞的迁移途径

头部神经嵴主要产生面部的结构,上下颌、牙齿和面部肌肉群均由这些细胞定位后分化形成。后脑沿其前后轴分节成为菱脑节(rhombomere)。鸡胚头部的神经嵴细胞根据它们菱脑节的起源,有 3 条迁移路线(图 10.15)。从 r2 菱脑节起源的神经嵴细胞迁移到第一咽囊(下颌)并形成三叉神经的神经节;r4 菱脑节起源的细胞迁移到第二咽囊(形成颈部的舌软骨)并形成膝状神经和听前庭神经的神经节;r6 菱脑节起源的神经嵴细胞迁移到第三和第四咽囊中,形成胸腺、甲状腺和甲状旁腺,也形成迷走神经和舌咽神经的神经节。起源于前脑和中脑的神经嵴细胞参与形成鼻突、腭和第一咽弓的间质。第一咽弓在鱼类变为鳃盖的一部分,在人类形成颌骨、中耳的砧骨和锤骨以及大部分面部肌群。起源于后脑前区的神经嵴细胞形成第二咽弓的间质,它产生人耳的镫骨和许多面部的软骨。颈部的神经嵴细胞参与形成第三、第四和第六咽弓的间质(人的第五咽弓退化),以及颈部的骨骼和肌肉。

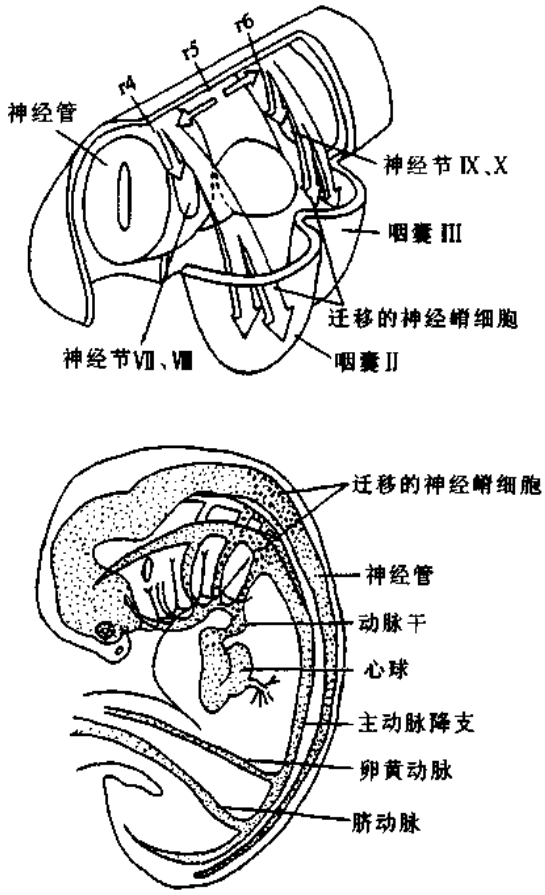
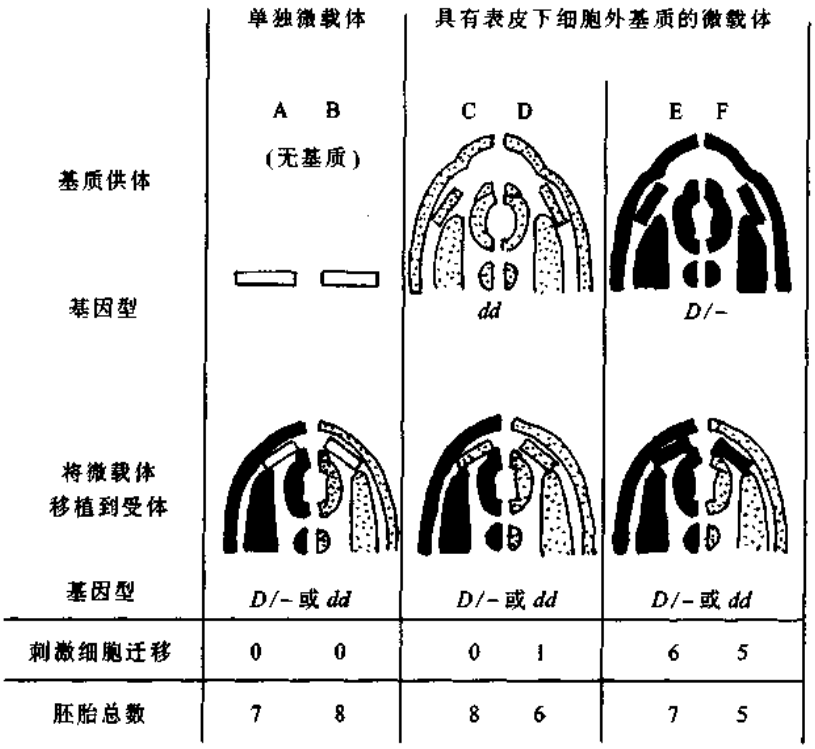


图 10.15 小鼠头部 r4～r6 菱脑节的神经嵴细胞的迁移路线

2. 神经嵴细胞迁移的机制

神经嵴细胞并不是在体内随意迁移的,而是遵循精确的路线迁移。实验证明,当相连的神经管和神经嵴被颠倒时,神经嵴细胞继续向外迁出,然而它们是向背侧而不是向腹侧移动。这表明它们遵循由神经管引导的定向移动。另外,当神经嵴细胞或它们的衍生物被植入受体正常的神经嵴细胞迁移路线上时,它们将沿着这条路线迁移;而当被植入到其他类型的胚胎细胞中时,它们将停留在原处不迁移。这表明神经嵴细胞能识别胚胎中的一些途

径，并沿着它们迁移。神经嵴细胞的迁移好象是受迁移路线表面的基质控制的。最明显的证据来自蝾螈突变体的研究。这种突变体可以形成神经嵴，但神经嵴细胞不能沿背侧部途径迁移。所以在其胚胎中除了神经管背部以外其他地方看不到色素细胞，神经管背部的色素细胞最后也将退化。当野生型的神经嵴被移植到突变体的胚胎中时，这些神经嵴细胞不能迁移；而当突变体的神经嵴被移植到野生型的胚胎中时，它们的细胞能正常迁移。在突变体胚胎内神经嵴细胞不能迁移的原因不在于细胞本身，而是由于细胞所处的环境。如果将取自突变体皮肤表皮下的细胞外基质转移到膜的微载体上，并把它们植入到神经嵴细胞开始迁移前的突变体和野生型胚胎的神经嵴附近，微载体本身以及含有取自突变体细胞外基质的微载体，均不引起突变体或野生型的神经嵴细胞的迁移。然而，含有取自野生型的细胞外基质的微载体可刺激突变体的和野生型的神经嵴细胞的迁移(图 10.16)。此结果表明，细胞外基质在实现神经嵴细胞迁移中起重要作用。



刺激细胞迁移	0	0	0	1	6	5
胚胎总数	7	8	8	6	7	5

图 10.16　细胞外基质在神经嵴细胞迁移中的重要性

在移植实验中，细胞外基质成分被携带于野生型(黑色)和突变体(斜线)的供体和受体胚胎之间。上排代表供体胚胎，下排表示野生型和突变体的受体胚胎，携带基质的微载体加到它们之中。刺激表示在微载体区域看到神经嵴细胞从神经嵴迁移的次数

细胞外基质含有大量不同的各种成分，对于是哪种成分在神经嵴细胞的迁移中起主要作用尚存在许多争论。但普遍认为，迁移的起始依赖于神经嵴细胞彼此的粘连和神经嵴细胞与细胞外基质间粘连趋势间的平衡。当神经嵴细胞与基质间的粘连趋势大于神经嵴细胞间的粘连趋势时，神经嵴细胞将开始迁移。有实验证据表明，在神经嵴细胞开始迁移时，两种因子相互作用：当基质变得容易与细胞结合时，细胞与细胞的粘连减小。引起这种减小的原因是神经嵴细胞表面特异神经细胞黏着分子的消失。实验发现，在白化型的美西螈中，当神经嵴细胞已准备好迁移时，细胞外基质不能改变其成分以加强与细胞的粘连。分子免疫探针实验证明，适宜神经嵴细胞迁移的细胞外基质成分是许多混合的分子，如纤连蛋白(fibronectin)、层粘连蛋白(laminin)、肌腱蛋白(tenascin)、各种胶原(collagen)分子和一些糖蛋白(proteoglycan)。在不同的物种中，神经嵴细胞可能具有不同的迁移要求，即使在同一

胚胎的不同部位也是如此。所以要找出哪一种分子是神经嵴细胞迁移所必需的，是一个极其困难的课题，需要进行精心的设计。通过制备神经嵴细胞结合的细胞外基质分子的抗体，并把它们注入到鸡胚神经嵴细胞迁移经过的一定区域，结果发现头区神经嵴细胞的迁移路线被极大地改变，而躯干部神经嵴细胞的迁移路线没有明显的改变。其他的细胞外基质成分，如透明质酸(hyaluronic acid)被认为可引起细胞游离空间的形成，因而使神经嵴细胞容易进入其中。据报道，透明质酸链作为神经嵴细胞和基质间的连接可在二者间看到，将透明质酸注入胚胎中可改变神经嵴细胞的迁移路线。

另外，通过移植实验证明，当较老的神经嵴细胞被植入到一个较年幼的胚胎中时，较老的细胞能迁移到神经嵴细胞所占据的所有区域中。然而，反过来将较年幼的神经嵴细胞植入到较老的胚胎中时，大多数神经嵴细胞被限定在原位，形成背神经节。这些结果提示，神经嵴细胞在迁移过程中可能改变它们已经过的路线，使其他神经嵴细胞不能利用这条相同的路线；或者随着体节的进一步发育，已消除了这些路线。同时也提示，将要形成最远端组织(如交感神经节)的神经嵴细胞首先离开神经嵴迁移。最近已在鸡胚中用活体染色的方法证实了上述推测。

3. 影响神经嵴细胞多能性的因素

神经嵴细胞一个最大特点是它们的多能性(pluripotentiality)。它们是一个具有明显可塑性的细胞群，能产生各种类型的结构。实验证明下列一些因素影响神经嵴细胞多能性的表达。

(1) 在胚胎内的位置

一个神经嵴细胞根据它在胚胎内的不同位置，可分化出几种不同类型的细胞。例如，由颈部的神经嵴细胞形成副交感神经元，产生乙酰胆碱作为其神经递质；而由胸部的神经嵴细胞形成交感神经元，产生去甲肾上腺素。但是，当将它们换位移植时，原来胸部的神经嵴细胞形成副交感神经节中的乙酰胆碱能神经元；而原来颈部的神经嵴细胞形成交感神经节中的肾上腺素能神经元。此后发现，在迁移前来自颈部和胸部二者的神经嵴细胞都具有合成乙酰胆碱和去甲肾上腺素的酶类。另外，在正常情况下不产生神经元的神经嵴细胞在一定的条件下能产生神经元。在正常情况下，中脑区的神经嵴细胞迁移到眼内，与色素视网膜相互作用形成巩膜的软骨细胞。但是如果将这个区域的神经嵴移植到躯干部，它们能形成感觉神经节的神经元、肾上腺髓质细胞、神经胶质细胞和施万细胞。

(2) 生长因子

随着神经嵴细胞的迁移，它们的潜能逐渐受到限制。由移植实验提示，许多神经嵴来源的、形成背根神经节中的感觉神经元的细胞，不能形成感觉神经节的自主神经元。这些细胞分化的机制可能涉及对生长因子的不同要求。感觉神经元的前体似乎要求一种由神经管本身产生的生长因子。如果将一层薄的不渗透膜插入到神经管和预定背根神经节之间，神经节就不能形成。对背根神经节的这种影响，可通过向载体膜上附加一些神经管的提取物或脑源的神经营养因子(一种来自神经管的蛋白质)防止其发生。那些定型的神经嵴细胞形成交感神经节不需要这种生长因子。相反，它们的分化似乎要求一种碱性成纤维细胞生长因子的刺激作用。

(3) 细胞外基质

细胞外基质的类型对于蝾螈神经嵴细胞的分化是重要的。如将美西螈的神经嵴细胞培养于表皮下的基质上，它们将变成黑色素细胞。然而，同样的神经嵴细胞培养于背根神经节区域的基质上，它们发育成神经元。

(4) 激素

鸡胚中那些迁移到肾上腺髓质区的神经嵴细胞能向两个方向分化。这些细胞通常分化为去甲肾上腺素能交感神经元。然而，如果这些神经嵴细胞被给以肾上腺皮质细胞分泌的糖皮质激素

(glucocorticoid),它们将分化为肾上腺髓质细胞。

四、外胚层板

除神经管和神经嵴细胞之外,神经元还有一个重要的来源,即一些增厚的外胚层区,称外胚层板(ectodermal placode)。外胚层板仅发现于头部和那些变为柱状上皮的外胚层区(图 10.17)。外胚层板包括胚胎最前端的嗅基板(nasal placode)和后端的听基板(otic placode)。嗅基板将产生嗅觉感受器的嗅上皮。嗅上皮的神经元分化为双极神经元,其周围树突被特化为检测与其上方嗅粘膜上皮接触的空气中的分子,中央轴突向内伸入嗅球。听基板将产生内耳的感觉上皮和听神经节或螺旋神经节及前庭神经节的神经元。这些神经节细胞最后也变为双极神经元,具有一个终止于毛细胞的周围树突和一个投射到脑干的中央轴突。另外,一系列小的基板,如鳃上基板(epibranchial placode)和中间基板(intermediate placode),像听基板一样产生脑感觉神经节中的一些神经元。三叉神经节、舌咽神经节和迷走神经节的一些神经元也起源于外胚层板(图 10.17)。

在这些基板中细胞形态发生的行为是不同的。一些基板将内陷,最后完全与外胚层脱离形成一个上皮球。如听基板首先内陷形成听窝(otic pit),然后与表面的外胚层完全脱离形成一个听泡(otic vesicle),最后经历复杂的变化形成内耳(图 10.18)。

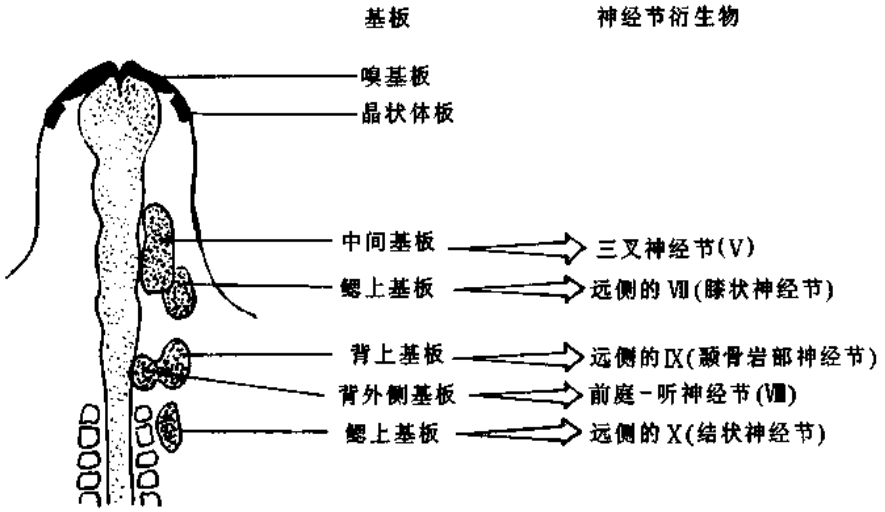


图 10.17　2 天鸡胚头部外胚层板的位置及其在成体中的衍生物

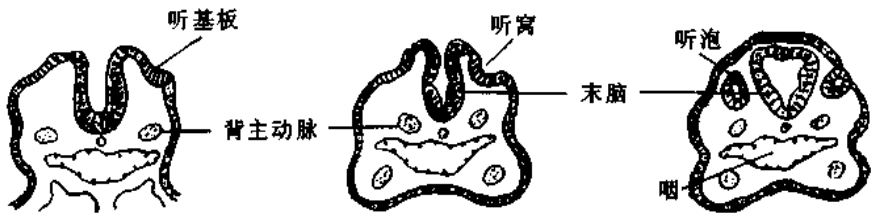


图 10.18　听基板发育的三个阶段

又如,嗅基板首先也内陷,但从未与外胚层完全脱离。它们形成增厚的外胚层囊,称为嗅窝

(alfactory pit),最后形成嗅上皮,它包含所有司嗅觉的特异神经元。组成第Ⅰ对脑神经(嗅神经)的神经元就是由嗅上皮产生的,它们在大脑的嗅球中形成突触连接。

另一种不同的形态发生行为见于鳃上基板、中间基板和听基板,它们产生的神经细胞分布于头部的感觉神经节。这些基板形成后不久,单个的细胞由增厚的上皮分离出来,随后与神经嵴细胞结合形成脑的感觉神经节。

由基板产生的细胞均分化为神经元,而神经嵴细胞则分化为神经元或神经胶质细胞。

五、在神经系统的组织发生中细胞黏着分子的作用

在神经系统的组织发生期间,一个重要的过程是相同类型细胞的聚集和通过细胞间局部的相互作用建立的模式。在此过程中,相同类型的细胞聚集到特定的核团或层中。

最近的研究表明,细胞黏着分子(cell adhesion molecule, CAM)和基质黏着分子(substrate adhesion molecule, SAM)在上述聚集过程中起重要的作用,它们调整发育期间细胞与细胞间的相互作用。细胞黏着分子控制形态发生的动力学:①CAM 的表达在建立细胞集中的边界期间遵循一个严格的时间表;②CAM 功能的紊乱将明显地改变组织形成的模式。

细胞黏着分子是一些不同类型的糖蛋白,它们在细胞表面表达并促进细胞的相互黏着。现在了解最清楚的是神经细胞黏着分子(N-CAM),肝脏细胞黏着分子(L-CAM)和神经胶质细胞黏着分子(Ng-CAM)。神经细胞黏着分子和肝脏细胞黏着分子出现于非常早的发育时期,二者在所有的细胞上表达。在神经诱导作用以后,神经板只表达神经细胞黏着分子,而体节外胚层只表达肝脏细胞黏着分子。在内胚层和中胚层的次级诱导作用期间,神经细胞黏着分子和肝脏细胞黏着分子之间存在着系统的转变,这对建立细胞集合间的边界是重要的。随着神经系统开始分化,神经胶质细胞黏着分子在完成有丝分裂后的中央神经系统的神经元上表达,它在生长中的神经突起上特别明显。它也在神经元的细胞体上强烈地表达,并引导那些沿辐射状神经胶质细胞迁移的神经元的突起。神经细胞黏着分子和神经胶质细胞黏着分子均存在于施万细胞和周围神经系统的神经元上,虽然神经细胞黏着分子在神经嵴细胞迁移期间从细胞上消失,但它随着神经嵴细胞在神经节内形成时的重聚集而重新出现(图 10.19)。在此后的分化期间,神经细胞黏着分子在所有的神经元上表达。然而,神经细胞黏着分子存在着从胚胎形式向成体形式的化学转变,这涉及唾液酸残基的丧失和结合性质的变化。随着进一步的分化,神经胶质细胞黏着分子特别在有髓鞘的神经束中消失。细胞黏着分子在模式形成中起作用的证据是,各种各样的细胞黏着分子的抗体干扰正常的形态发生。例如,已发现抗神经细胞黏着分子的抗体能破坏视网膜中层状结构的形成;而抗神经胶质细胞黏着分子的抗体则能破坏发育的小脑中颗粒细胞的迁移和培养中的神经突起的集束。显然,有关产生细胞聚集成核和细胞分层的分子机制还有待更进一步的深入研究,但关于细胞黏着分子的研究肯定是代表了一条极有希望的路线。

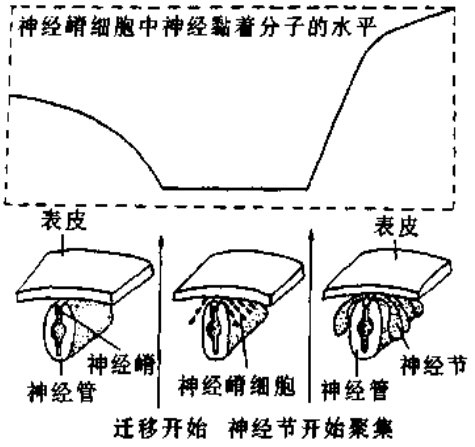


图 10.19 躯干部神经嵴细胞迁移开始和终止后聚集期间神经细胞黏着分子的表达

六、在神经系统发育中程序化的细胞凋亡

在任何已知的脑区中，神经元的总数是固定不变的。显然，神经元的数目被精确地调整着，即使在神经细胞增殖和迁移的阶段也是如此。虽然对在增殖和迁移阶段的调整机制还了解甚少，但像在许多其他的组织中一样，神经系统调整细胞数目的一种机制是程序化的细胞死亡，即自然发生的细胞凋亡(apoptosis)。现在对控制这一过程的一些机制的了解是相当清楚的，有关的主要因素有以下几方面。

1．靶组织

早期的研究发现，切除鸡的附肢芽引起与之相连的脊髓段中运动神经元数目的极度减少，支配附肢的感觉神经节的体积也减小。相反，如果移植一个额外的附肢到发育中的鸡胚的躯体部，以提供附加的靶组织，结果脊髓中存活的神经元的数目增加，而且感觉神经节的体积增大(图10.20)。上述结果被许多研究者进一步证实和扩展。最初对这过程不甚了解，认为靶组织以某种方式调节脊髓中神经元的增殖范围。此后的研究发现，被控制的不是细胞的增殖，而是细胞的凋亡。Hamburger 和他的同事(1939—1980)在发育的鸡胚中进行了精细的定量研究后提出，在许多组织中存在着起初的细胞过量增殖和此后出现的细胞凋亡时期。增删靶组织影响的是细胞的凋亡而不是最初的增殖。例如，在感觉神经节中，起初存在比成熟时多的神经细胞，细胞数目的调整是由于在特定的发育阶段一定比例的细胞的凋亡。类似地，侧运动柱的宽度起初沿脊髓是固定不变的，但随着发育的进行，在脊髓不与附肢连接的节中，即在除臂节和腰节之外的节中，柱的宽度变细(图 10.21)，侧运动柱中神经元的数目在发育期间减少约 40%(图 10.21D)。另外，切除靶组织后发生的萎缩是由发生细胞凋亡的范围增加引起的。自然发生的细胞凋亡的一个重要特点是它发生于一个精确的时间。对某些系统来说，这个时间与轴突到达靶组织的时间大致相当。因此，在发育早期的一段时间，神经的发育与靶组织无关，而在与靶组织形成连接后变得依赖靶组织。

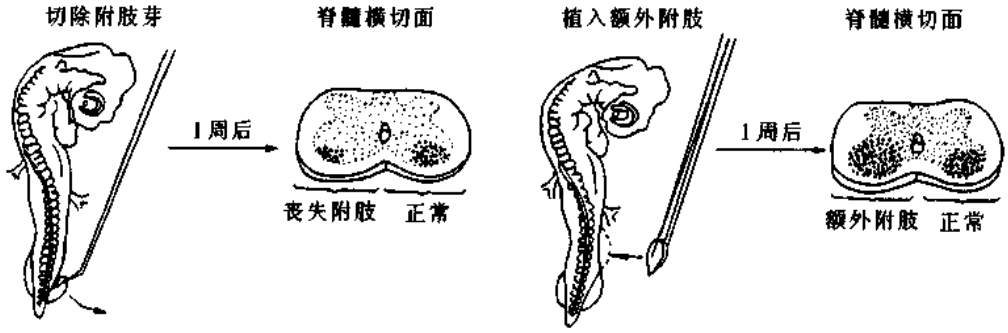


图 10.20　鸡胚切除或增加靶组织(附肢)对运动神经元存活的影响

细胞的凋亡似乎也涉及对靶组织的竞争。例如，阻止其他神经节细胞接触睫状神经节细胞的靶组织，睫状神经节细胞群的死亡减少。在鸡胚中，通过切除一侧的眼而强迫脑两侧的峡－视核神经支配于单眼时，核中的细胞凋亡增加。因此，减少突触前细胞可得到靶组织的数目，或增加竞争可得到靶组织的突触前细胞的数量，突触前细胞群中的细胞凋亡增加；反之，增加可得到的靶组织，或减少竞争可得到靶组织的突触前细胞的数量，则细胞凋亡减少。

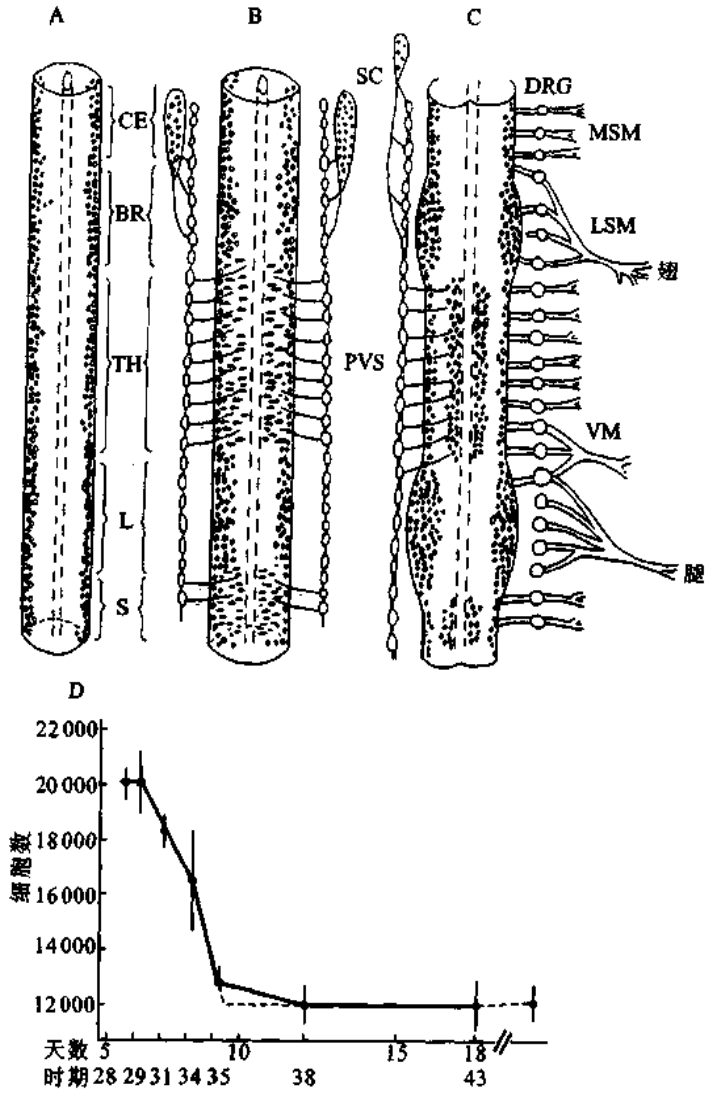


图 10.21　鸡胚自然发生的细胞凋亡

A～C. 在正常发育中，运动柱中神经元的数目随细胞的迁入而增加，此后在自然发生的细胞凋亡期间减少。在脊髓无神经分布到附肢的区域细胞凋亡最广泛，而在提供翅和腿神经分布的脊髓臂节和腰节较少　D. 自然发生的细胞凋亡的时间过程

2. 神经生长因子和营养因子

Levi－Montalcini 和 Hamburger(1951,1953)发现，将小鼠肉瘤移植到鸡胚的尿囊绒毛膜中，它能诱导感觉神经节的肥大和交感神经、感觉神经纤维异常惊人的生长。因为肉瘤并不是直接移植到鸡胚中，所以这种作用可能是通过一种可扩散的物质调节的。这种物质被称为神经生长因子(nerve growth factor,NGF)。

在解释神经生长因子作用机制的过程中，利用在培养中神经生长因子对背根神经节产生明显影响的优势进行研究发现，神经生长因子似乎主要对哺乳类和鸟类的两类神经元——交感神经节细胞和背根神经节细胞的维持和存活所要求。向新生的小鼠或大鼠注射小剂量的神经生长因子抗血清，仅数天就发现交感神经节几乎完全消失。在体外培养分离的交感神经节细胞时同样证明，

神经生长因子的主要作用是促进神经细胞的存活。神经生长因子的丧失增加交感神经节细胞的凋亡，它的存在促进细胞的存活。如果哺乳动物的感觉神经节在胚胎发育的较早期失去神经生长因子，将出现感觉神经节细胞的严重缺乏。

其他的证据表明，神经生长因子起一种由靶组织产生的营养因子的作用。第一，神经生长因子能被对它敏感的神经元吸收，并从终末分支反向传送到神经元的细胞体。第二，神经生长因子存在于交感神经轴突的靶组织中。第三，外源提供的神经生长因子可促进由于切断轴突而与其靶组织分离的交感神经元的存活。此外，外源的神经生长因子能减少自然发生的神经细胞凋亡的数量。某些类型的中央神经系统神经元也对神经生长因子敏感，而且能通过外源提供的神经生长因子从逆向变性中复活。

3．传入神经的调节

有证据表明，神经元的存活能被传入神经的神经支配所控制。在鸡胚听觉系统的研究中发现，耳内神经支配的消失导致直接接受第Ⅷ对脑神经投射的脑干核中细胞凋亡的增加。此后的研究发现，在孵化后鸡的第Ⅷ对脑神经被破坏时，细胞的凋亡也会发生(图 10.22)。正如靶组织调节神经细胞的凋亡一样，在最初的连接形成以前，神经细胞的发育依赖它们的传入神经。然而在发育晚期，这些神经元对除去传入神经不太敏感。这表明在发育的一定时期，除去传入神经的神经支配将增加细胞的凋亡。

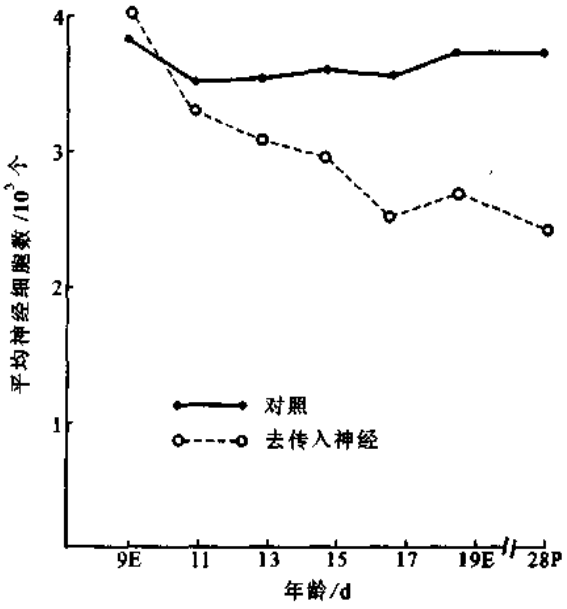


图 10.22　在鸡胚听泡发育过程中切断传入神经支配引起的细胞凋亡

图示在不同育龄的实验组和对照组中，蜗核同系物中神经元的平均数

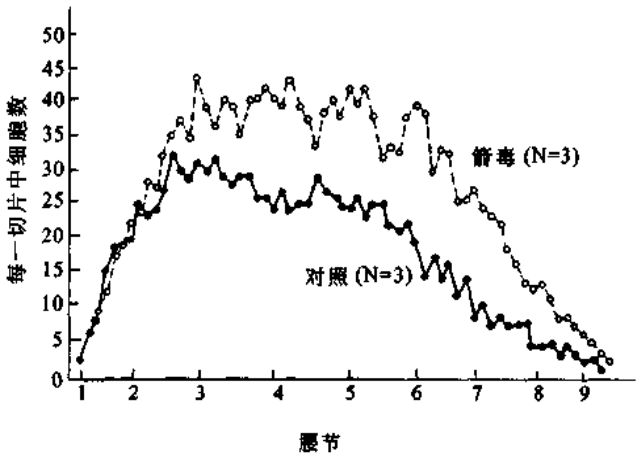


图 10.23　当神经－肌肉之间的传递活动被箭毒阻断后，脊髓运动柱中自然发生的细胞凋亡减少

4．功能活动

在正常发育期间，细胞凋亡可能还受功能活动的影响。在鸡脊髓的侧运动柱中，当神经－肌

肉之间的传递活动被箭毒长时间阻断后，神经细胞的凋亡被延迟(图 10.23)；而当传递活动恢复时，细胞的凋亡又重新开始。

第二节 神经连接的形成

为了正确地执行传递和加工信息的功能，神经系统依赖神经元之间以及神经元与外围靶器官之间形成高度特异的相互连接。显然，这种高度特异的连接要求在发育期间有一种高度精密的控制机制。在发育初期，当神经元完成了组织形态发生和迁移到其合适的位置后，还须构筑它们的轴突和树突，并形成二者及其与其他非神经细胞之间的连接，以执行其功能。

一、神经突起的发育

神经突起(neurite)在这里笼统地指神经元的轴突和树突。因为在发育早期，轴突和树突在形态学上很难区分。另外，它们的生长至少在两个方面是类似的，即神经突起从一个未分化的细胞体上形成的机制及其在生长过程中膜增加的机制。

1. 轴突和树突的形成

现在认为神经突起从细胞体的什么地方形成是由该起源细胞本身固有的因子决定的。另外，形成突起的数目也是由细胞内在的因素调节的。因为典型的神经元只产生一个轴突和根据细胞的类型产生一定数目的树突，而且轴突和树突形成的位置也是具有该细胞的属性。如大脑皮层中的锥形细胞，其树突干起源于锥形细胞体的顶端，而轴突则由锥体基部生出。通常锥形细胞在大脑皮层中排成一行，它们顶端的树突指向皮层表面，而轴突朝向白质。然而，由于有时细胞完成迁移后不能进行完全 180°的旋转，可能处于与正常情况完全颠倒的位置。此时仍由锥形细胞体的基部伸出一个轴突，它起初的生长方向朝着皮层的表面。而顶端的树突向相反方向生长，朝向白质(图 10.24)。这些结果表明，轴突和树突从细胞体向外生长的位点和它们生长的方向都是由锥形细胞本身所固有的因子决定的。

现在还不知道不同类型的神经元突起的起始位点是怎样调节的。有人提出神经元的细胞骨架或细胞器可能起一定的作用，因为在神经元形成神经突起的位置发现这些细胞结构成分出现聚集。另外，对体外培养的神经母细胞瘤的研究发现，最后一次有丝分裂产生的姐妹细胞发育出镜面对称的神经突起。因此有人提出最后的有丝分裂决定了神经元细胞体的极性。

2. 神经突起的伸长

神经元轴突和树突的伸长需要新的细胞膜、原生质和细胞骨架成分一起附加到生长的突起中。体外组织培养的实验证明，新膜被附加到突起的顶端，而细胞质和细胞骨架的成分被附加到突起的基部。因为如果新膜被附加到突起的整个长度或基部的话，那么在突起分支间节的长度将随着轴突的伸长而增加。然而在实验中发现，在培养神经元的轴突伸长期间，分支间的距离保持不变(图 10.25)。这表明轴突的生长是其顶端伸长的结果。但这并不排除在轴突建立其连接后及在皮层成熟增厚时树突中分支间节内生长的情形。

3. 轴突的生长锥

神经元轴突和树突生长的末端被称为生长锥(growthcone)，它是一种高度能动的细胞结构特

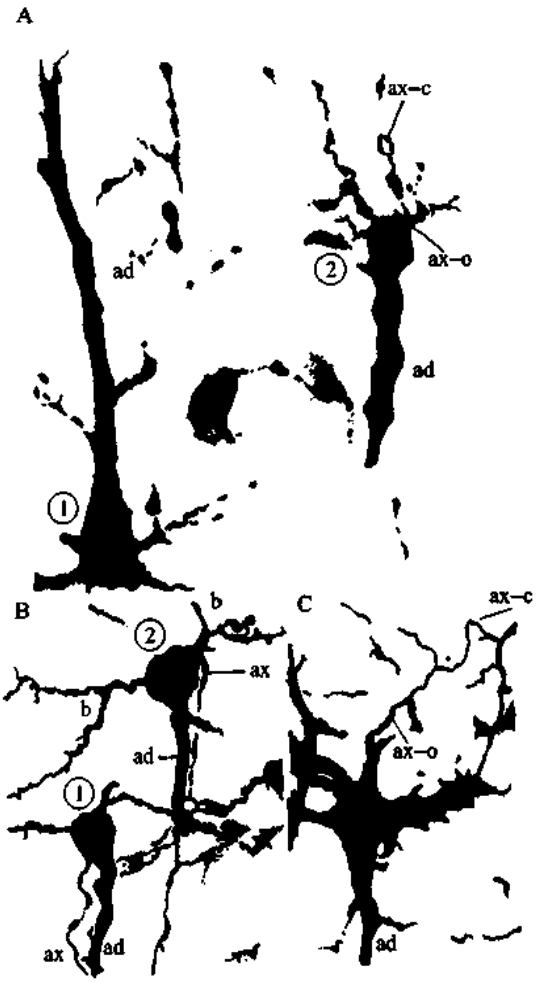


图 10.24　兔大脑皮层中颠倒的锥形细胞

A. 正常定向的锥形细胞①和颠倒的锥形细胞②。轴突(ax－o)从锥形细胞的基部产生，起初向软脑膜表面生长，在生长几微米后形成发卡样的转折(ax－c)；顶端的树突(ad)正常定向长向白质　B. 成年兔枕部皮层中两个颠倒的锥形细胞。细胞①的轴突起源于靠近树突的细胞体，而细胞②的轴突起源于树突的基部(b)；这两个细胞的顶端树突根据细胞体来看定向是正确的　C. 一个颠倒的锥形细胞。其轴突起源于细胞体的基部，然后转向白质

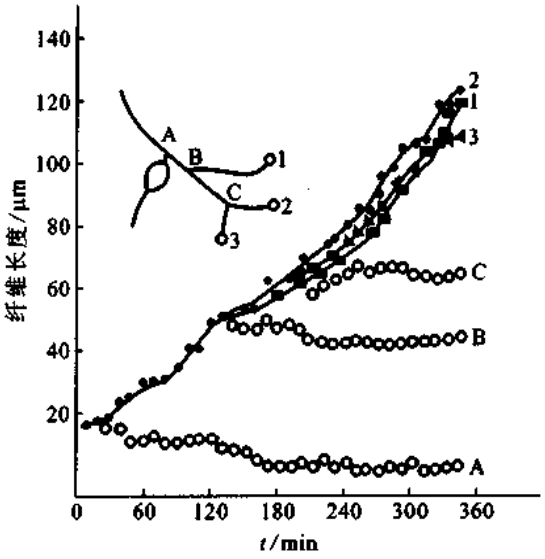


图 10.25　轴突在顶端的生长

在组织培养中间隔不同时间测量单个神经元的轴突长度。轴突的长度一直增长，但分支形成后细胞体到分支间的距离并不增加，表明轴突伸长是其顶端的增长

化形式，呈薄扁平膜状，伸出一些细长的丝状伪足作为其延伸部分(图 10.26)。这些丝状伪足以 6～10 μm/s 的速度伸展和收缩。在薄膜和丝状伪足的下面有许多微棘(microspike)。免疫细胞化学的研究证明它们是肌动蛋白(图 10.26B)。在生长锥中含有许多小泡，它们可能是新合成的膜。轴突中含有的微管和神经微丝部分地伸展到生长锥中，但并不伸展到丝状伪足和生长锥的中央部位。生长锥在离开细胞体后，几乎完全被与细胞环境的相互作用所引导。对组织培养中生长轴突的研究发现，生长锥好像用其丝状伪足探索它周围的细胞环境。当遇到不利情况时缩回；当遇到有利地带时，就停留下来，而轴突将沿这个地带生长。前面提到的大脑皮层中被颠倒的锥形细胞，

其起初朝向皮层表面生长的轴突，很快调转方向朝白质生长。

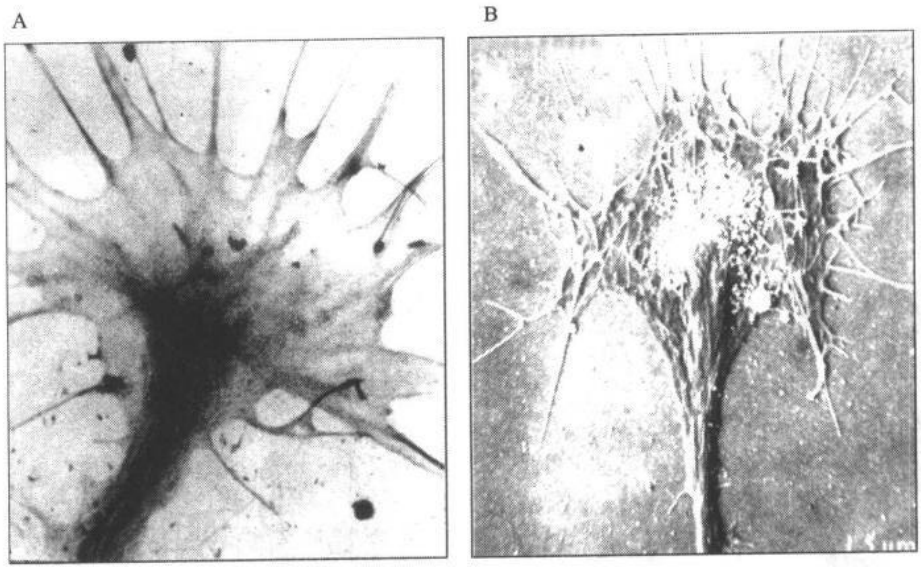


图 10.26 轴突生长锥中的肌动蛋白微棘

A. 透射电镜照片 B. 荧光显微镜照片(用肌动蛋白抗体标记)

4. 先驱神经纤维

在神经的轴突生长期间，先驱神经纤维(pioneer nerve fiber)处在其他神经纤维前边，成为引路的向导。当先驱神经纤维的生长锥到达靶组织时，由于是在发育早期，它穿越的距离相对较短，所经过的胚胎组织环境相对来说是不复杂的。到发育晚期，随后的神经纤维与先驱神经纤维结合成束，共同进入靶组织。现已证明，在某些情况下，当其他神经纤维到达靶组织时，先驱神经元已死亡。然而，如果以某种方式阻止先驱神经元的分化，其他神经纤维将不能到达它们的靶组织。

二、轴突生长的引导

各种各样的外部因素影响轴突生长的路线。在动物体内，轴突要经过长距离的生长，绕过其他神经元，交叉穿越其他神经通道，最后准确到达其支配的靶组织。这种精确的生长过程依赖于某些因素对轴突生长的引导。

1. 触向性

触向性(stereotropism)是指轴突倾向于沿着一定的表面生长。这是一种机械的影响生长的因子。早期组织培养的研究表明，在培养皿中轴突倾向于沿着刺激或伸展的细胞质凝块生长。并由此提出，轴突沿着室管膜神经胶质细胞表面穿过神经上皮产生基质生长。虽然机械因子可以为轴突的生长提供某种引导，但它不能完全解释大多数轴突显示出的高度特异的生长。尤其不能解释当不同系统的神经纤维彼此交叉或混合时，轴突如何分辨它们自己，而这种情况在中央神经系统的发育中是非常普遍的。

2. 基质的粘连性

实验表明，轴突与某些物质的粘连比另外一些强，而且它们沿着可粘连的物质生长比沿着不粘连的物质要好些。例如，当培养皿的底部被一种粘连物质(如多聚鸟氨酸、层粘连蛋白等)呈方格状覆盖时，培养中的轴突优先沿着可粘连的物质生长，并完全避开粘连性低的区域。在活体内轴突好像确实沿着可选择的基质生长。如一些轴

突好像沿基板生长。因为不同神经系统的纤维常常相互混合，但此后又沿不同的路线分开。如用不同粘连性质的基质来解释轴突特异的生长，那么不同的神经元必定具有不同的粘连特性。此外还必须存在某种粘连的方向性，以便解释在中央神经系统中轴突定向地特异生长。一种可能的情况是，存在粘连物质的梯度，轴突向着较高粘连性的区域生长。但迄今还没有关于不同的神经元、不同的基质或粘连性梯度的大量直接证据。然而，轴突之间和轴突与基质之间自然发生的相互作用为这样的粘连可能性提供了一些线索。如中央神经系统中神经束的存在，可能起源于轴突间同一种选择的粘连，表明它们沿着一定的基质生长的原因。在体外培养中，生长的神经元与一种物质的粘连和它与其他轴突的粘连之间存在一种相互的关系，与基质的粘连性的减少，将增加神经束的形成。

各类轴突间选择的粘连可能是由于细胞膜上互补的识别分子的结果，如前边提到的细胞黏着分子。

3. 向电性

轴突引导的早期理论提示，轴突的生长方向可能受电场的影响，称为向电性(galvanotropism)。虽然此假说已争论多年，但最近的研究又重新引起人们对它的兴趣。现已发现，在发育的胚胎和再生的附肢中存在电势梯度，生长的轴突对这种电场具敏感性。这种电场被认为是由局部发电的细胞膜泵产生的，并已测到高达 100 mV 的电场。对培养中生长的轴突施加一个几毫伏的电场，可以影响到轴突的生长过程，这些轴突将向阴极生长，但要有相当大的电场才能产生这样明显的影响。在活体内对轴突生长产生如此明显作用的可能性极小。

4. 向化性

另一个被普遍接受的假说是，轴突的生长是根据化学的线索运行的，称为向化性(chemotropism)。此假说认为，神经元根据靶组织释放物质的扩散梯度运动，向高浓度的向性物质区生长，最终到达其源头(神经元的靶组织)。向性物质是由靶组织释放的，它吸引生长的轴突，而且是细胞存活所必需的，能刺激细胞的代谢作用。

正确区别这种向性物质是非常重要的。第一，一种可扩散的化学定向因子是在靶组织中产生的，并释放到细胞外的基质中；第二，它能影响轴突生长的方向，尤其是轴突在向靶组织生长的过程中对其梯度起反应；第三，这种物质一定在适当的时间存在，即在轴突向靶区生长期间和轴突完成接触之前，此因子的产物浓度应当最高。

对轴突生长的影响的最好证据来自神经生长因子(NGF)。第一，它是一种可溶性蛋白质，是在交感神经轴突的靶组织中产生的，能极大提高交感神经和来自背根神经节轴突的生长。第二，神经生长因子梯度能影响生长的轴突所采取的路线。在体外培养情况下，对神经生长因子敏感的神经元轴突，将选择性地向含有神经生长因子溶液的毛细管处生长(图 10.27)。

关于神经生长因子作为一种可扩散的向化性因子的想法，受到了 Davies 等(1987)实验的挑战。他们测定了神经生长因子在发育期间表达的时间过程，结果发现神经生长因子直到靶组织被感觉神经元接触以后才由靶组织大量产生，这与预期的结果相反。另外，神经生长因子的受体也是直到生长的轴突到达靶组织以后才在神经元上检测到。这种时间的分析提示，在引导生长的轴突到达其靶区的过程中，靶组织产生的神经生长因子可能只起极小的作用。它更像是作为一种营养因子，在神经元形成接触之后维持这些神经元的存活。

即使向化性物质是由靶组织产生和释放的，它们也只能在短距离内影响轴突的生长过程。因而可以肯定，可扩散物质的梯度不像是在超过数毫米以上的长距离中影响轴突生长的原因。

5. 生长路线的标记

大多数轴突最初的生长是高度定向的和高度特异的，即使当它们离靶区相对很远时也是如此。如运动和感觉神经元沿着高度固定的路线生长到附肢中。由此提出轴突是沿着在其生长路线上存在的化学标记物运动的假说。这一假说得到一些实验证据的支持，即轴突的确显示出对一定物质的优先选择。如果将 7 天鸡胚的背根神经节培养于涂有神经生长因子的方格基质上时，这些感觉神经元的神经突起优先分布于富含神经生长因子的基质上，而避开不含神经生长因子的区域(图 10.28)。而用 17 天鸡胚的背根神经节做同样的实验时，却表现出不同的生长模式：神经元伸出的突起同样地通过含有和不含神经生长因子的区域生长。这些结果表明，轴突可能沿着神经生长因子标记的路线生长，但在发育的不同时期对同样标记的路线表现出不同的选择。

另外，在昆虫神经轴突生长的研究中发现，轴突不仅沿着预定的路线生长，而且与一些可辨认的细胞接触。因而将这些可辨认的细胞作为轴突生长的“路标”。虽然轴突并不与这些细胞形成真正的接触，但在蝗虫中，生长

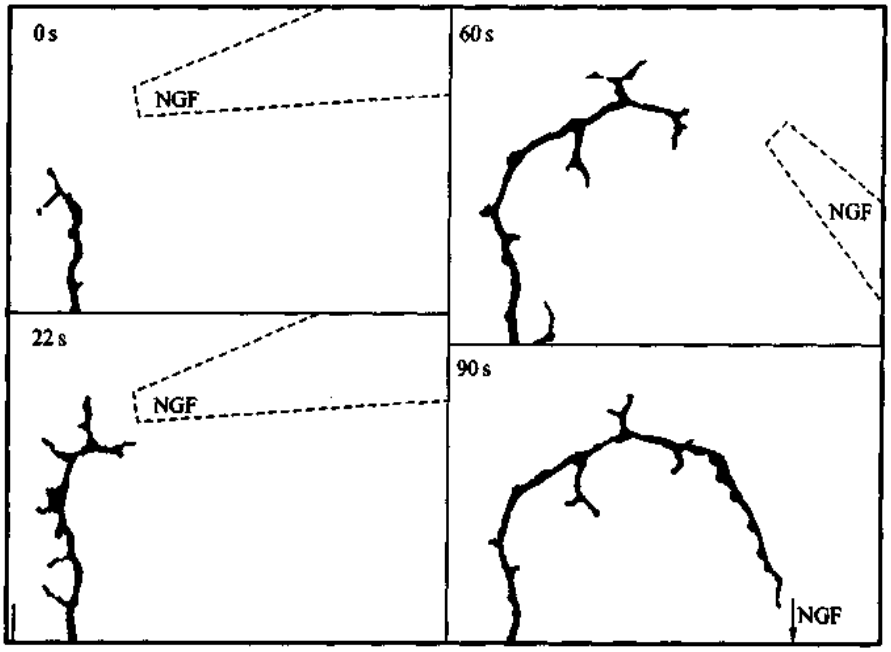


图 10.27 神经生长因子的诱向影响(仿 Purves 和 Lichtman,1985)

图示一个背根神经节细胞神经突起的远端对从毛细管(虚线)扩散出的神经生长因子的反应。左上方示持续时间。实验开始后 90 s,神经突起伸长了 108 μm,并从它起初生长的方向旋转了 160°

到附肢的感觉神经的轴突在除去作为"路标"的细胞后,轴突就不能正常地生长(图 10.29)。

但是,神经生长的某些方面好像并不与标记的路线一致。例如,轴突常常从它们的正常路线上转移,但最后仍然能到达靶区。因此有理由认为,有许多的因子在引导轴突从它们的起点到达靶区的过程中起作用,这是一种综合的相互作用。

三、轴突的过度增生和撤消

一些轴突的投射在起初比在成熟时期较少具有特异性。在某些系统中,轴突在早期明显地过度增生(overproliferation),增生的轴突投射到在成熟动物中通常并不投射的区域。这些"异位"的投射在此后的发育中被撤消(withdrawal)。例如,许多在成体中明显是单侧的路径,在发育早期是双侧的。视网膜的投射就是这样一个例子。在成熟的大白鼠中,大多数向中央神经系统的视网膜投射是交叉的;然而在早期发育阶段,确实存在一种的同侧的投射,这种投射随动物的成熟逐渐消失。这些投射的消失可能是依赖相关投射系统间某种相互的竞争作用。因此,如果将对侧的眼球除去,这种同侧投射将被保留下来。另外,这种竞争的相互作用可能依赖神经活动。当用钠离子通道阻断剂河豚毒素阻断神经节细胞的活动时,能起到与摘除眼球相同的作用。对灵长类视网膜投射的研究发现,投射的消失可能有助于正常特异性的发育。在高等哺乳动物中,由视网膜伸向背侧膝状核的投射被分开进入眼特有的薄层。然而,在发育早期从视网膜来的投射终止于整个背侧膝状核,没有形成薄层。因此认为,从两眼来的轴突的终末分支在经过一个广泛的重叠时期以后,才分别进入非重叠的薄层。对猴视神经轴突数目的定量研究发现,在早期发育中存在的轴突数目比在成年时期实际保留下来的轴突数目多(图 10.30)。视神经轴突的消失发生于从两眼来的轴突的终末分支分别进入侧膝状核的大致相同时期。因此认为,进入不适当薄层的投射因轴突的

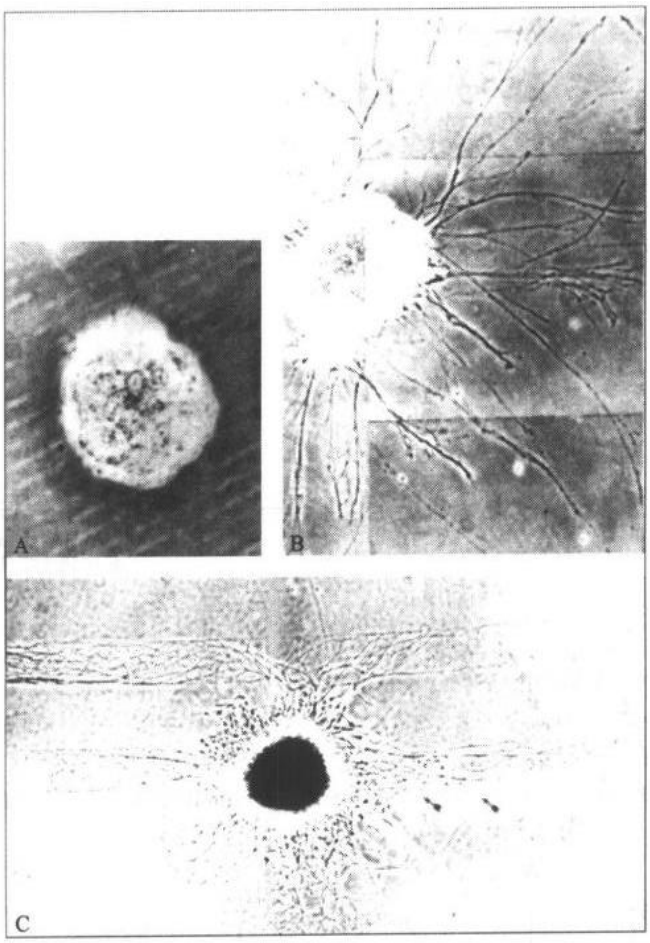


图 10.28　体外培养的视网膜组织块不同的生长情况

A. 在未用纤连蛋白处理的塑料培养皿上培养 36 h，未见有神经突起向外生长　B. 用 50 μg/mL 纤连蛋白处理塑料培养皿后神经突起的生长情况，与 A 比较，可见大量神经突起向外生长　C. 在Ⅳ型胶原背景上涂上平行条状层粘连蛋白时，培养的感觉神经元的轴突沿层粘连蛋白呈平行条状生长

撤消而消失。

轴突过度增生和撤消的另一个例子是皮层离心的路径。在成年动物中，只有少数皮层区产生皮层脊髓投射。然而在年幼动物中，在一些广泛区域产生这样的投射，它们随动物的成熟而撤消。另外，两个大脑半球间相互连接的模式也是通过投射的撤消建立起来的。

皮层与皮层间投射的集中涉及某些细胞完全撤消它们的投射。这已被辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)的逆行标记所证实。在年幼动物中，注射 HRP 导致注射同侧的整个大脑皮层中的细胞被逆行标记。然而，在成熟的动物中，相同的注射只引起一定区域的逆行标记。

虽然在发育期间由某些系统形成的"异位"突触消失了，但这不是发育的错误。相反，这些异位接触可能在运输信息到发育的神经元中起重要作用，或在调节突触的发育，或在神经元本身的分化中起一种重要的作用。轴突一到达其靶区就将形成特殊的突触接触。突触的形成将要求突触后细胞精制它们的树突接收表面。

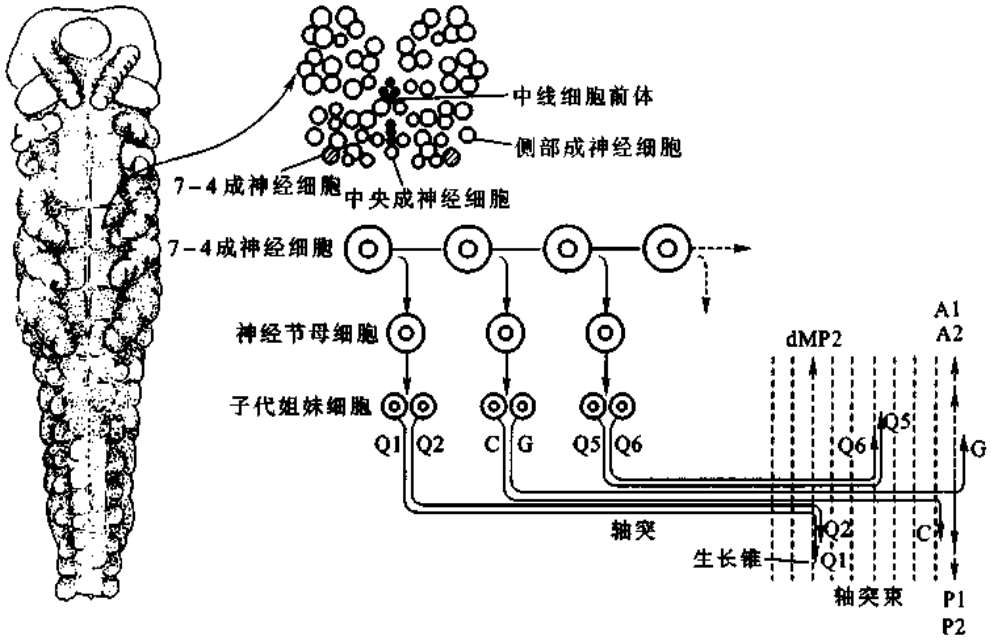


图 10.29　早期蝗虫胚胎 17 个体节中每一个都具有相同的成神经细胞模式

每侧 30 个成神经细胞，中间 1 个成神经细胞和 7 个中线细胞前体。中线的成神经细胞只分裂一次，而侧部的成神经细胞是干细胞，它们反复分裂形成神经节母细胞。每个神经节母细胞再分裂一次产生两个姊妹神经元。成神经细胞 7－4 有接近 100 个子细胞，在此只显示其中前 6 个。它们的轴突沿固定的细胞标记路线生长

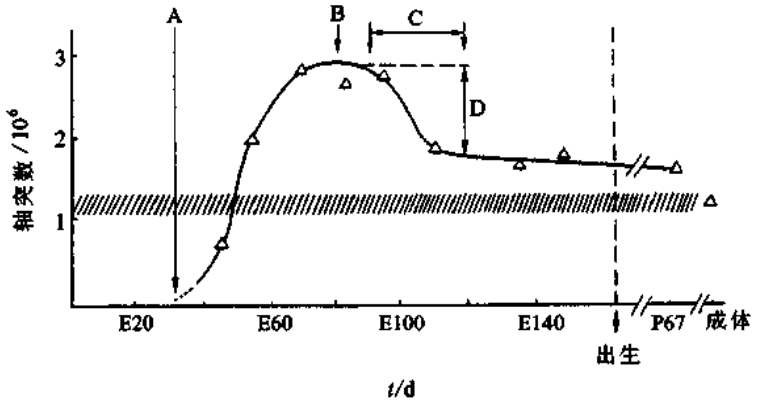


图 10.30　在发育早期视神经轴突的过度增殖和撤消

计数在胚胎期和出生后不同年龄的罗猴视神经轴突的总数。斜线表示成年罗猴视神经轴突的数目。A 箭头示视网膜神经节细胞发生的起始点(用^{3}H－胸腺嘧啶核苷标记)，B 箭头示神经节细胞组织发生的终点，C 示在侧膝状核中从两眼来的视网膜投射分离的时期

四、树突的发育和分化

树突起初的向外生长，正如前边提到的轴突的生长一样，是由神经元固有的因子决定的。在离开细胞体后不久，轴突主要根据组织环境进行生长的定向。而树突则较少受组织环境影响，树突形成的许多方面仍是由神经元固有因子决定的。在树突分支的进一步精制中，固有因子与外部

环境影响间的相互作用还不清楚。

1. 树突的发育

在发育时间上，树突往往与传入神经的生长和突触连接的形成平行发育。如在大白鼠的齿状回中，颗粒细胞的树突大约在出生时开始分化，大约到出生后 30 天时基本完成。传入神经生长和突触形成均在此时期内发生。

类似的模式发生在小脑皮层的浦肯野细胞中。从形态观察中发现，浦肯野细胞也或多或少地在平行纤维发育的同时精制它们的树突。对其他脑区的研究发现，某些神经元是在它们正常的传入神经到达之前精制树突分支。在小鸡听觉系统的研究中发现，某些细胞只产生一个树突分支，它比将在成体中保留的分支产生更广泛地分布。在鸟类上橄榄核(olive)的同源物中，神经元具有双树突，它们接收从两侧耳蜗核来的输入。在耳蜗核中，树突长度系统地变化着。接收高频率输入的耳蜗核神经元具有最短的树突，而接收低频率输入的那些细胞具有最长的树突。然而在发育初期，耳蜗核中所有细胞都产生广泛的树突分支。在此后的发育期间，那些将接收高频率输入的细胞的树突分支被大大地删除了(图10.31)。一种类似的树突过度增生也发生在鸟类的前腹侧蜗核

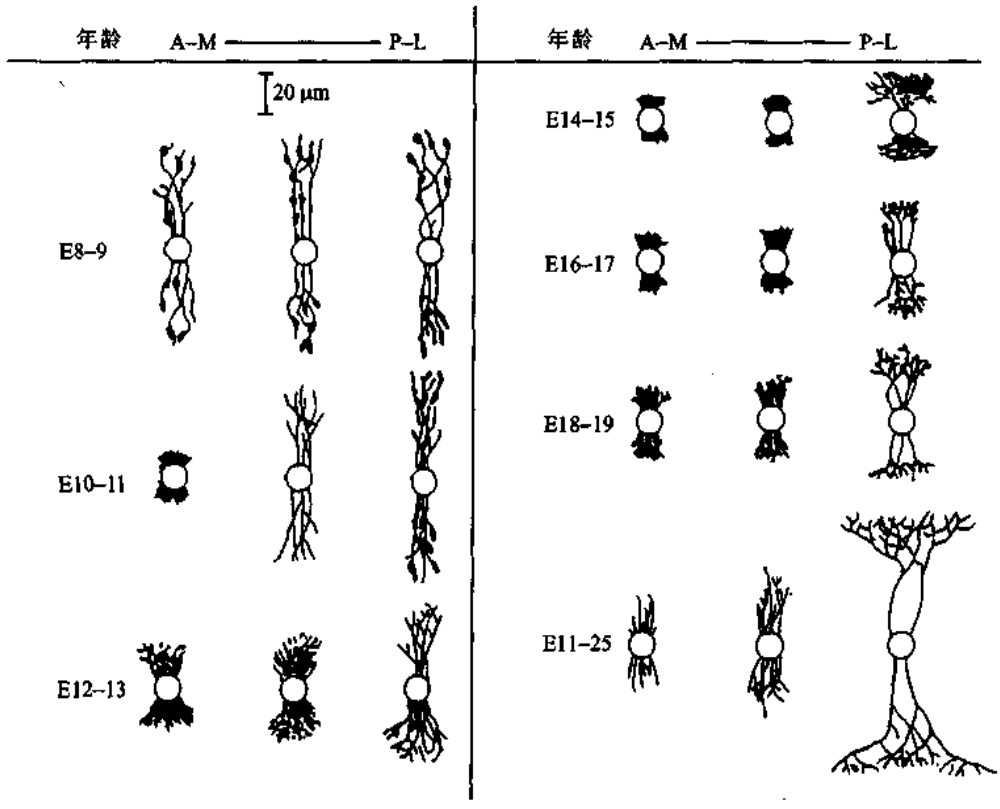


图 10.31　在脑干听核中神经元发育期间树突的过度增生和删除

鸟类的层核是哺乳动物上橄榄核的同源器官，此核中的神经元具有双极的树突，树突的长度系统地变化着。接收高频率输入的耳蜗神经元具有最短的树突，而那些接收低频率输入的神经元具有最长的树突。因此在此核的前中－后侧轴上树突长度存在一个梯度。在早期发育期间，此核中所有的神经元起初建立了一个比在成熟时期更广泛分布的树突树。此图简明表示用高尔基染色发现的在不同年龄核的不同部位神经元的树突分支

A－M——P－L：前－中——后－侧

同源器官中。在成年鸡中，那里的神经元具有较大的细胞体，几乎没有什么树突。然而在发育的早期，这些神经元具有较广泛分布的树突分支，它们随着蜗核的成熟被撤消。以上结果表明，树突的发育象轴突的发育一样，可能包含了或是从未分化的状态到其最终单调形式的进程，或是从起初的过度增生到随后的收缩。前一种发育模式与传入神经调节树突分化的作用一致。后一种模式提示，树突的分支可能不依赖传入神经而发育，但传入神经可能在决定那些树突将被保留中起作用。

2. 树突的分化

为了获得传入神经在树突分化中起作用的直接证据，许多研究观察了破坏传入纤维的神经支配后对树突发育的影响，但所得的结果并不一致。某些神经元在缺少传入纤维的神经支配或当正常的传入神经受到严重的破坏时，仍有能力发育出正常的树突分支；而另一些类型的细胞则似乎对传入神经的存在非常敏感，有时甚至对传入神经的活动都非常敏感。

在体外组织培养条件下，使神经元完全脱离它们正常的细胞环境，树突仍能在极不寻常环境中被神经元表现出来。例如，一些细胞类型能在生长于神经系统异常部位的移植片中很容易地被识别出来。这些细胞在适当的时间不能接收它们正常的传入神经。另外，树突形态学的一些特点也能在培养中的神经元中表现出来，而且不同类型的神经元能被很容易地彼此区别开。

在活体内不改变神经元的正常位置，只破坏传入神经的实验结果表明，某些神经元在缺少传入纤维的神经支配时，仍能形成基本正常的树突分支。例如，交感神经节细胞尽管只有个别神经细胞有传入纤维的神经支配，但它们仍能正常地形成大致相同数目的树突。这提示，发育期间树突和它们的传入神经之间必定存在某种竞争。当传入纤维的向内生长被人工防止时，树突的发育仍能发生，神经元继续形成正常数目和长短的树突。许多神经元树突的形成似乎不仅依赖于传入神经的存在，而且还依赖于神经支配到树突的突触功能活动。例如，在影响小脑颗粒细胞分化的突变体中，浦肯野细胞不能接收它们正常的神经支配。这些浦肯野细胞的树突比正常短得多，而且显示出较小分支，但仍可辨认得出这些树突是浦肯野细胞类型的。感觉神经的丧失也能导致感觉神经元中树突大小和定向的明显改变。例如，在小鼠出生日摘除单眼后，由于视神经的丧失明显地导致视皮层中星形细胞树突的重新分布。通常，星形细胞的树突在皮层的第Ⅳ层广泛地分支，丘脑的传入纤维也终止在这里；在摘除单眼后，星形细胞的树突明显地分布到相邻的层中，好像是避开第Ⅳ层(图 10.32)。这个结果表明，树突的分布范围改变了，但仍能很容易被识别出是星形细胞典型的树突。

树突的发育是否依赖传入神经的影响不是一个简单的问题。综上所述，一个树突的一般形态是由其本身固有的因素决定的。然而树突较精细结构的建立依赖于与传入神经持续的相互作用及其功能活动。对传入神经的依赖性是否反映了树突发育或树突保留的一种调节，目前还难以确定。

五、局部地域有序投射形成的特异性

在生长的轴突到达其靶区以后，它们扩展开并找到各自特异的靶区位点，形成局部地域有序投射(topographically ordered projection)。通常，局部地域有序投射图形的建立涉及轴突生长的特异性，因为它存在于神经末梢区域，轴突在保持最邻近相互关系的基础上与靶细胞建立联系。但在视觉系统中的研究表明，这种解释不能说明终末有序模式形成的原因。虽然在视神经中存在某种局部地域有序投射，但正确连接的形成并不依赖于这种投射。因为在某些物种中，神经轴突的局

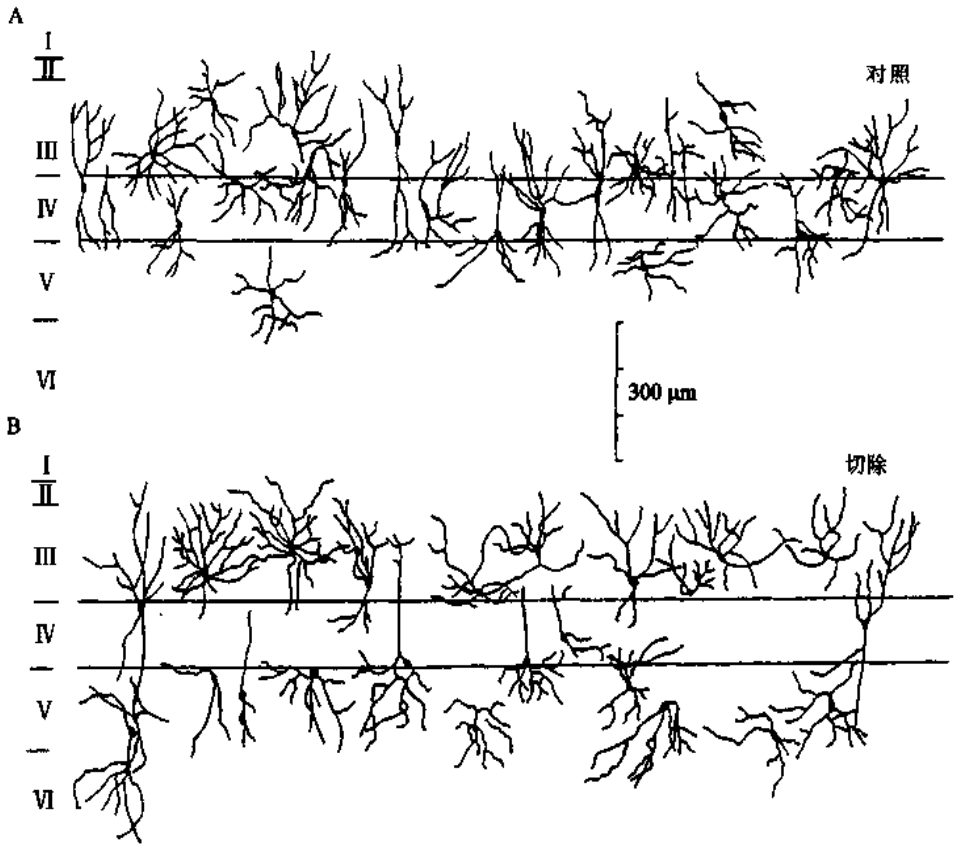


图 10.32　在出生时摘除单眼的小鼠视皮层中星形细胞树突的重新定向

A. 在正常小鼠中，星形细胞的树突在第Ⅳ层中广泛分支，此层是从侧膝状核来的纤维的终止区　B. 在出生时摘除单眼的小鼠中，星形细胞的树突避开第Ⅳ层，在邻近的层中分支

部地域有序投射起初并不是精确的，但发育后期的连接却是精确的。另外，在低等脊椎动物（鱼类和两栖类）视神经投射再生的研究表明，即使有个别轴突偏离它们正常的路线时，这种有序的投射仍可形成。因此认为，有序连接的建立是轴突和它们的靶组织间的相互作用的结果，即局部地域有序投射的建立是与突触连接的形成同时发生的。

1. 化学亲和性假说

关于局部地域有序投射形成的最有影响的假说，是由 Sperry(1963)提出的化学亲和性假说(the chemoaffinity hypothesis)。这一假说是在有关低等脊椎动物视网膜－顶盖系统的研究中得出的。鱼和蛙的视觉系统提供了进行这种研究的优越性，因为它们的视神经在损伤后能够再生。Sperry 发现，在损伤视神经后，视网膜投射再生模式中有一种选择性。当视神经被切断而视网膜保持完整时，再生的视神经纤维能在顶盖中重建它们正常的局部地域投射。然而，当视神经被切断和部分视网膜被破坏时，来自视网膜剩余部分的神经纤维有选择地再生到这些纤维正常应当分布的顶盖部分(图 10.33)。Sperry 认为，选择性连接的建立是因为突触前和突触后两部分具有相互识别和粘连的互补分子标记。

化学亲和性假说有以下几个前提：①神经元之间有内在的不同；②这种不同依赖于神经元所处的位置；③这种不同在本质上是生物化学的不同，而且在外部的细胞膜上表现出来；④这种不同存在于发育早期连接形成时；⑤具有互补分子标记的突触前和突触后细胞以一种有选择的和专一的方式彼此接触。这一假说的前 4 个前提的证据已通过定量分析体外培养条件下分离的视网膜细胞与顶盖不同部分细胞的连接而得到。化学亲和性假说认为，从

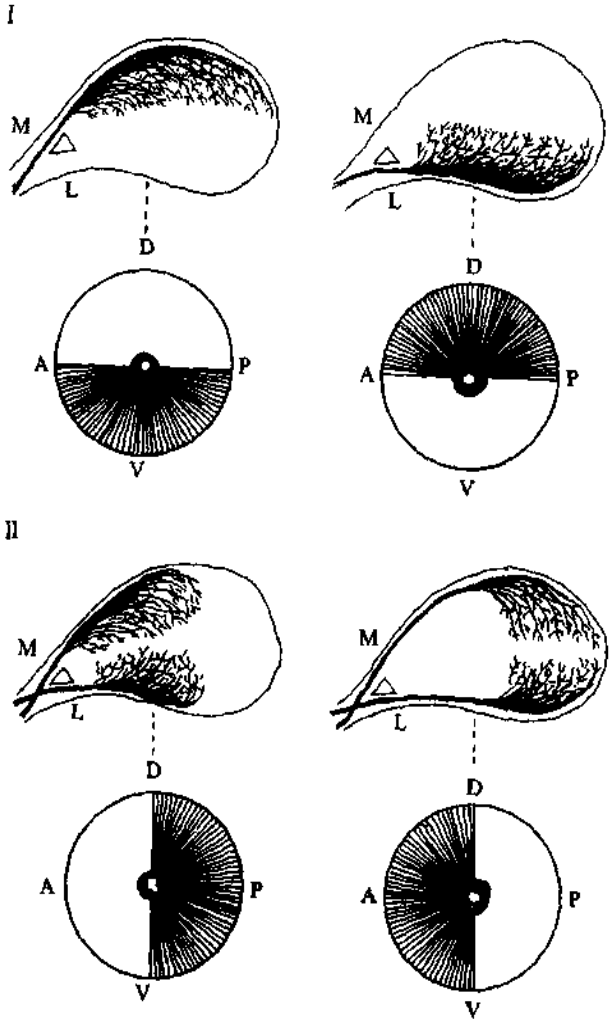


图 10.33　金鱼视神经损伤后其轴突再生的特异性

Ⅰ. 当视网膜的背侧被破坏时，存活的视网膜腹侧选择性地再生到顶盖的中间区域；当破坏视网膜的腹侧时，视网膜的背侧部分选择性地再生到顶盖的侧部位置　Ⅱ. 当视网膜的前(鼻)侧部分被破坏时，存活的视网膜后侧部分选择性地再生到顶盖的前侧部分；当视网膜的后(颞)侧部分被破坏时，视网膜的前侧部分选择性地再生到顶盖的后侧部分

M. 中部　L. 侧部　A. 前部　P. 后部　D. 背部　V. 腹部

视网膜腹部来的细胞优先结合于顶盖背部的细胞，而从视网膜背部来的细胞优先结合于顶盖腹部的细胞。这一结果说明，从不同地域单位来的神经元是固有的不同，此不同是依赖位置的，并与视网膜投射的正常地域相适应。因为这些不同是在粘连性检测实验中发现的，其中的细胞完整无损，表明不同存在于细胞膜上，而且此种不同在本质上可能是生物化学的不同。最后，该实验是用幼年动物视网膜中分离的细胞作的，这反映了发育早期细胞间的不同。近年来一直致力于验证化学亲和性假说的最后一个前提。然而不同的实验测定认为，此假说至少在其最具约束性的形式上是不正确的。此假说预言，一个已知突触前神经元的轴突只与合适的靶标结合；如果这个靶标不可得到，那么将没有合适的替代物。假说的这个方面已被视网膜和顶盖不同体积的组合实验和再生后测定所形成的连接的一系列实验证明是不正确的。

2. “压缩”和“扩散”投射的实验

"压缩"和"扩散"投射的实验主要包括两大类：一是完整的视网膜再生到手术后保留的部分顶盖中。根据化学亲和性假说，视网膜轴突只能与那些它们正常神经支配的细胞形成连接，因此那些正常应投射到顶盖失去部分的视网膜细胞将不能形成连接。但实际结果并非如此，视网膜顶盖的整个投射图形被"压缩"到存活的顶盖部分。再生的早期阶段，正如化学亲和性假说所期望的，再生的轴突具有形成合适投射的倾向，但经过一段时间后，这些连接被调整以匹配那些可得到的靶细胞(图 10.34)。另一类实验是破坏一部分视网膜，剩余部分的视网膜细胞再生的轴突投射到完整的顶盖中。结果是剩余部分视网膜细胞的轴突"扩散"投射到整个顶盖中(图 10.35)。这些实验的结果表明，刻板的细胞与细胞的特异性连接不是视网膜－顶盖高度有序的局部地域图形成的原因。大量的研究发现，在发育早期，存在一种连续的转变和连接的重组。在许多种动物的发育中，视网膜中和顶盖中细胞增加的模式是极其不同的。新细胞是同心圆式地加到视网膜中；而在顶盖中，新细胞被加到顶盖的尾部。在这两种不同的组织发生模式下，视网膜－顶盖间连接的建立和维持，应要求一种连接的重组。最初连接的建立，如同化学亲和性假说预言的，可能完全根据膜性质的不同进行。但局部地域投射的晚期调整可能涉及轴突和它们的靶标间，或许还有与其他轴突分支间的相互作用。因为连接是在发育期间被调整的，当连接合适时突触稳定，当连接不合适时突触消失。

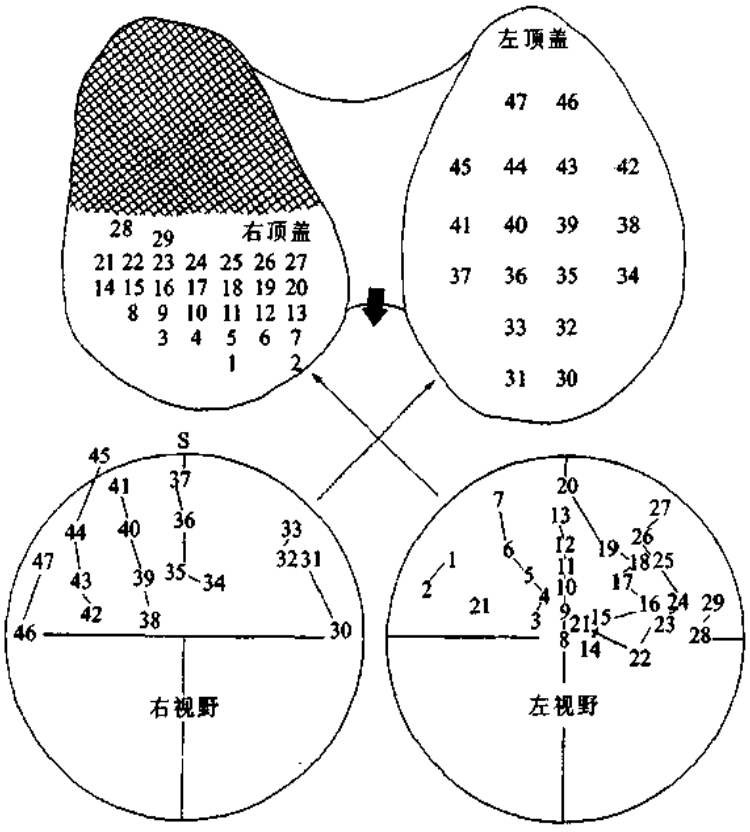


图 10.34　切除部分顶盖后视神经的再生

图上部示金鱼两侧的顶盖(背面观)，图下部是其视野。视网膜－顶盖的连接通过在视野中照射不同的光点和用电极在顶盖上做的记录进行分析。图中数字表示在视野中光点刺激的位置和在顶盖中对视野特定部位刺激起反应的细胞的位置。视网膜－顶盖连接的正常模式通过右眼到左顶盖的投射说明。左视网膜的投射已再生到半个顶盖中，在破坏顶盖几个月后，整个视野投射到保留的半个顶盖中

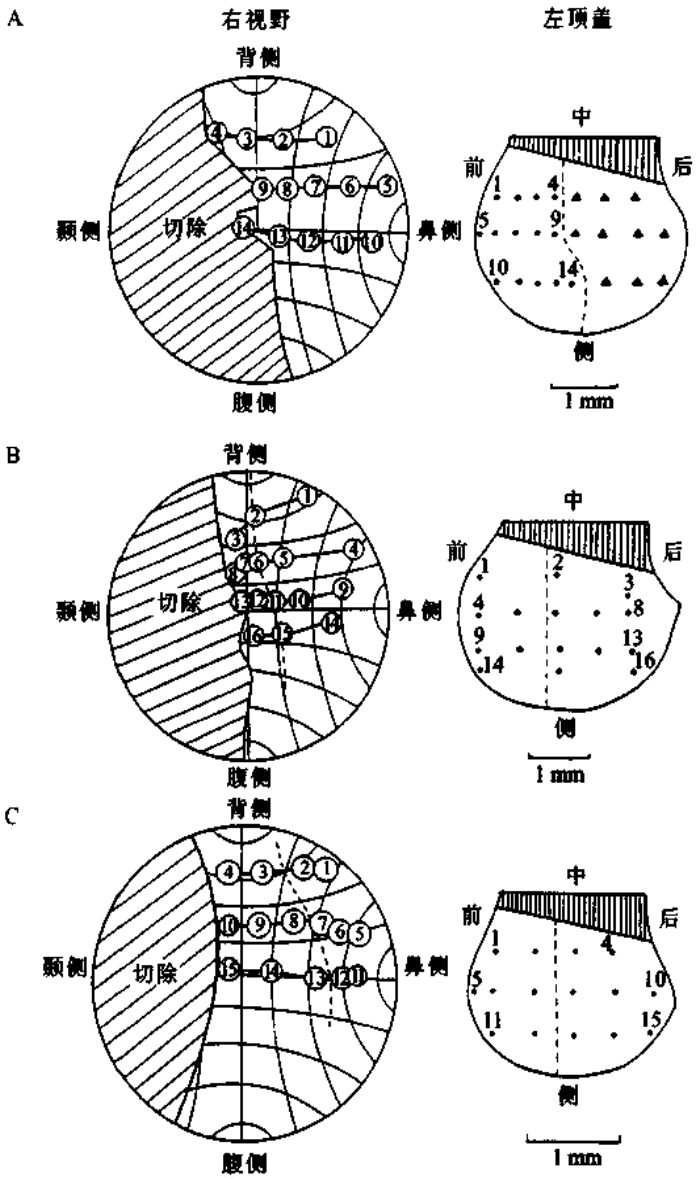


图 10.35　切除金鱼部分视网膜，同时挤伤视神经，在损伤视神经后不同时间用电生理学方法测定从剩余部分视网膜再生的轴突的结果

A. 切除部分视网膜和损伤视神经后 36 天，再生的纤维已收缩到正常神经分布的顶盖区域　B. 切除视网膜和损伤视神经后 171 天，视网膜－顶盖投射已部分地向顶盖后部扩展　C. 切除视网膜和损伤视神经后 282 天，此时视网膜－顶盖投射进一步扩展，分布于整个顶盖

六、发育期间突触连接的重排

在单个的突触后细胞上连接的重新排列以及突触建立和消失的现象，在一些简单的神经系统中已得到证实。在这样的系统中，突触后细胞所接收的连接的数目被严格地控制着。单个的轴突和单个的突触后细胞间形成一对一连接的系统中为这种研究提供了便利。在这样的系统中，在单一的神经支配之前常常有一个多重神经支配的时期，经过一段时间后，多余的神经支配消失，只有

一个传入神经被增强并稳定地保留下来。

1. 突触的消失和稳定

在成熟的哺乳动物中，单个的肌纤维通常与一个运动神经的突触终末相连接。但在发育期间肌肉纤维可能接受几个轴突的神经支配(图 10.36B)。在成年大白鼠的肌纤维中，当将逐渐变化的刺激加到运动神经时，可在肌细胞中记录到一个均匀振幅的突触后电位(postsynaptic potential, PSP)。而在发育早期的大白鼠中，对运动神经逐渐变化的刺激产生具有多重振幅的突触后电位。这一结果表明，具有不同临界值的几个运动神经轴突同时支配同一肌纤维。突触后电位的振幅数代表神经支配到肌纤维上的突触数。因此，在发育早期肌纤维是被多重传入神经支配的，而在发育期间除一个被保留外，其他的传入神经都消失了。类似的突触消失和稳定过程也发现于自主神经系统的神经节中。例如，在大白鼠颌下神经节中，神经元典型地被一个节前纤维神经支配；在兔睫状神经节中的神经元接收来自两条纤维的神经支配；而在仓鼠的上颈神经节中的神经元被大约 7 个神经元所连接(图 10.36A)。但在发育早期，上述三种情况的神经元都被大量的轴突所连接，而随着发育的进展，突触连接的数目逐渐减少。这些结果说明，突触消失的过程并不是最后形成一对一连接的情况所独有的。类似形式的突触重组也在中央神经系统中观察到。在鸟类听觉系统的研究中发现，第Ⅷ对脑神经的轴突与鸟蜗状核的同源体中神经元间的连接，在刚孵化时蜗状核的神经元平均接收 4 个第Ⅷ对脑神经的轴突；在出生后前两周开始减少，在成熟的鸡中平均只与两个第Ⅷ对脑神经的轴突相连接。相似的过程也发现于小脑皮层中爬行纤维与浦肯野细胞间连接

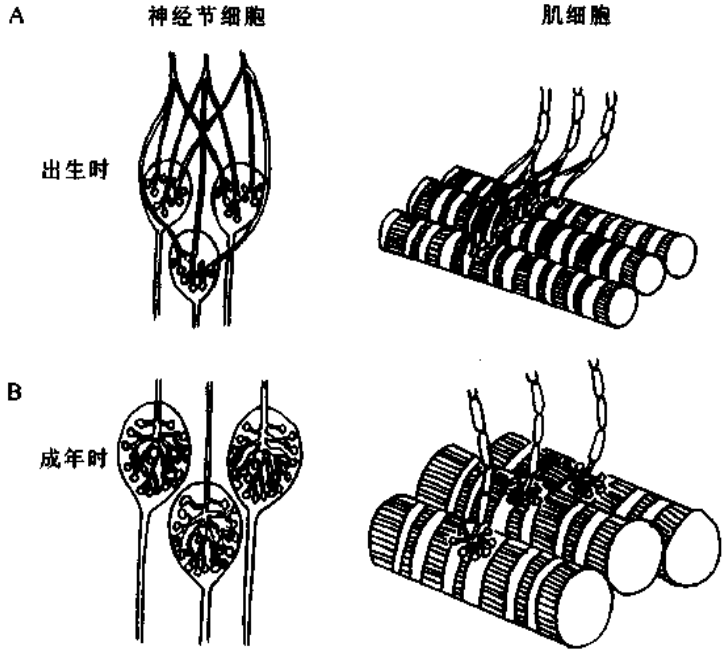


图 10.36　哺乳动物出生后最初几周期间周围神经系统中突触重排的主要特点

(自 Purves 和 Lichtman, 1980)

A. 在出生时每个轴突神经支配到较多的靶细胞　B. 当成年时每个轴突仅支配一个靶细胞，但此时轴突终末分支的大小和复杂性增加了

建立期间。在成年动物中，浦肯野细胞只被一个爬行纤维神经支配，而在幼年动物中被几个爬行纤维支配。

2. 回路的重排

在高等脊椎动物的视皮层中，从侧膝状核(lateral genicular nucleus)伸出的投射通常分开进入眼优势柱(ocular dominance column)，即从接收同侧和对侧眼输入的侧膝状核的薄层中发出的投射几乎遍及整个视皮层中。这些柱起初是被生理学的记录所证实，如果把一个电极沿切线方向插入皮层的第Ⅳ层，它将遇到优先对一只眼或另一只眼起反应的细胞柱。为了用膝状皮层投射模式说明柱形成原因，可以通过向一只眼内注射标记的蛋白质前体，并允许这些前体被跨突触地运输到与注射眼相对应的膝状皮层中而进行直接研究。结果发现，从每只眼投射到膝状皮层的纤维终末区域是呈交替的条纹状排列。然而在发育的动物中，从相对于一只眼投射到侧膝状核层的投射终末区是均匀的，不呈条纹状排列。因此，相对于两眼的投射必定是重叠的。投射的重叠表明，皮层中个别的神经元可能接收来源于两眼的侧膝状核纤维的输入。这已被电生理学的研究所证实。在条纹状的投射模式发育以前，皮层中大多数神经元对两眼中的每一只都起反应。电生理的研究结果证明，重叠的投射实际上与皮层中的神经元形成了功能性的突触连接。在正常发育期间，成年动物所特有的分离的模式逐渐形成。

3. 突触竞争

在发育过程中存在大量起初重叠的投射逐渐变得分离的例子。例如，在侧膝状核中两眼来的投射起初相互重叠，但此后分开进入不相重叠的层中。这种重叠投射的消失好像意味着，在两套非常相似的轴突间竞争对每一套都可能潜在的神经支配的突触后细胞群。这种突触间的竞争可能包含着一类突触的稳定和另一类的消失，这表明突触后细胞在此选择过程中的重要作用。突触间的竞争可通过除去一个竞争者后测定其影响而直接证明。如在一肌肉群中，当运动单位体积减少的时候，仅保留一个轴突，而除去所有其余的轴突。这时由存活轴突支配的运动单位的体积并不减少。类似地，如果一只眼睛被损伤，或其正常的活动被破坏(缝合眼睑使其完全丧失视觉)，则膝状核皮层中分离投射的发育被破坏，正常视觉被破坏的眼与皮层神经元之间的稳定连接比未破坏视觉的眼效力小些；形成眼优势柱的宽度，前者比后者窄得多。突触竞争可能是依赖于突触群的不同活动。在神经－肌肉连接发育期间，那些激活肌肉较有效的纤维是稳定的，而那些效力较小的纤维将消失。慢性瘫痪减少肌肉中突触消失的比率，而慢性刺激加快失活纤维的消失。

在中枢神经系统中采用稍微不同的规则。通常，不具有树突，或具有简单树突分支的神经元被一个或少数几个轴突产生的突触神经支配；而具有复杂树突分支的神经元接受大量不同的传入。实际上，不同传入的数目通常是与树突分支的复杂性有关。对许多神经元来说，不同类型的传入系统终止于树突的不同部位。例如，一类传入可能终止于近端树突，而另一类可能终止于远端树突。因此，对中枢神经系统的神经元来说，不同传入神经系统间的竞争可通过产生一种几何图形来防止，这种几何图形导致传入神经系统的分离，或是引导它们彼此竞争突触后细胞上的位点。

七、突触连接的构筑

突触连接的构筑要求其分子组成成分能被传送到突触位点；突触的膜成分必须插入到突触前和突触后的膜中，而且突触的细胞质成分要以某种方式位于合适的位置。例如，在突触前膜中，包括小泡的聚集和偶联刺激释放装置的组装；在突触后膜中，特化的成分也必须被组装，这包括受

体及它们相关的离子通道、识别分子和黏着分子、酶(如蛋白激酶和磷酸二脂酶)以及各种不同的结构分子。相对来说对突触前连接了解甚少。了解较多的是关于在体外培养中生长的脊髓神经元和肌细胞间形成的突触连接中乙酰胆碱受体补片的组装。用生理学的方法可以在一段时间内画出乙酰胆碱受体的分布图,此图可用选择的标记(如 α－银环蛇毒蛋白)从解剖学上加以证实。用上述方法进行的研究发现，在神经支配以前，乙酰胆碱受体扩散地分布于肌肉的表面，虽然存在少数具有较高密度的受体"热点"(图10.37)。但在神经－肌肉连接成熟时,乙酰胆碱受体在位于突触

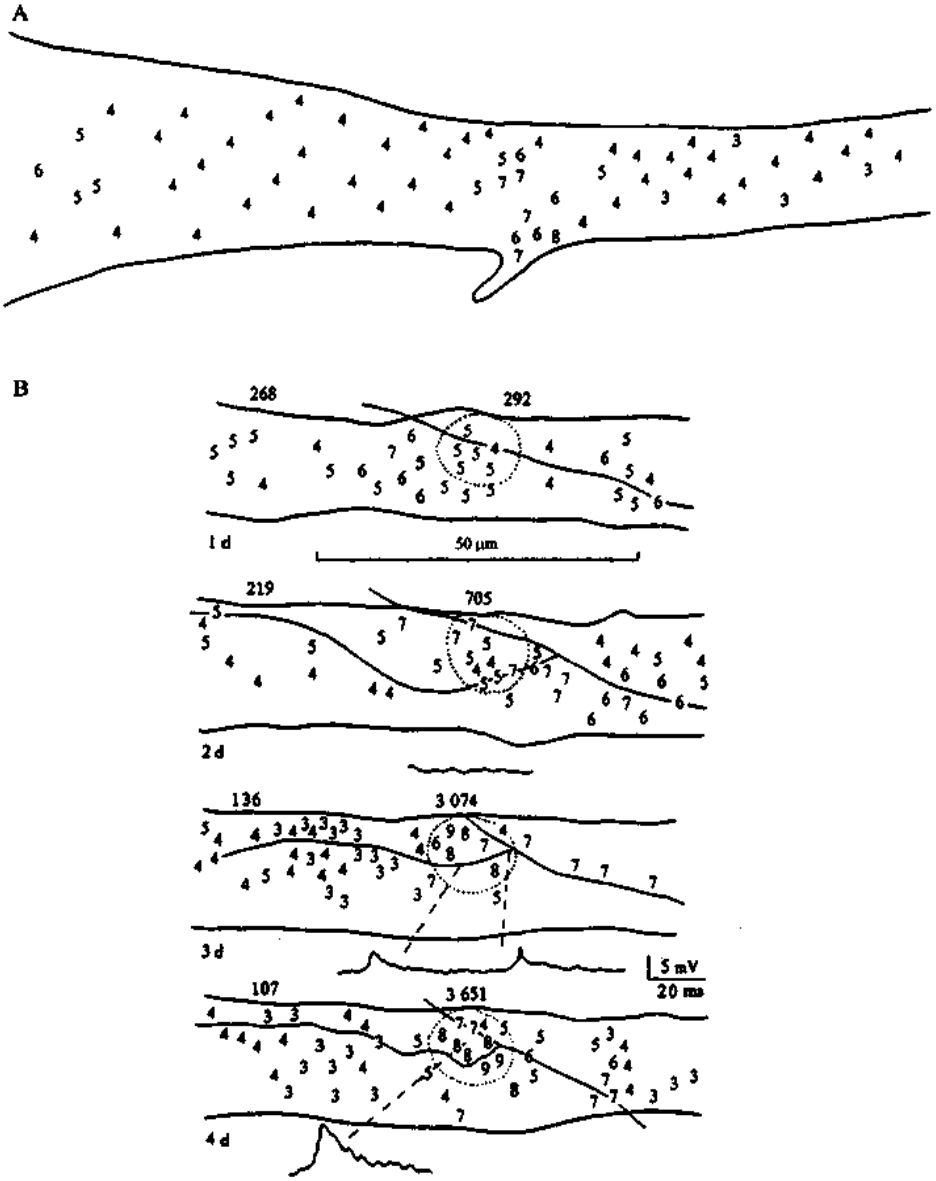


图 10.37　神经肌肉连接形成期间乙酰胆碱受体簇的形成

A. 在解剖学上,乙酰胆碱受体的分布可通过检测 α－银环蛇毒蛋白结合位点确定　B. 在生理学上,可通过在肌管的不同位点测定乙酰胆碱的敏感性确定。在 4 天中重复测定一个肌管上乙酰胆碱的敏感性,此时一个轴突在圈定的区域中建立突触连接。第一天在圆圈内乙酰胆碱敏感性类似于背景。第二天圆圈内乙酰胆碱敏感性开始增加,并在随后的两天中持续增加。图中数字大小表示乙酰胆碱敏感性高低

位点的下面最丰富。起初人们认为轴突可能优先分布到受体密度高的区域，然而实验证明并非如此。实际情况是，当生长的轴突与肌纤维接触时，它们形成突触的模式与神经支配前乙酰胆碱受体的分布几乎没有明显的相关。随着突触的形成，新的受体"热点"在突触位点下面形成。因此，受体分布由分散的模式转变成在突触下面受体密度最高的模式。这种高密度模式的形成从逻辑上看有两种方式：一是那些存在于膜中的受体聚集到突触的下面；二是新生的受体附加到突触位点的下面，并有"多余"受体的消失。事实上，在突触位点下面的受体补片几乎全是由新合成的受体形成的。虽然在补片建立以前就有一些受体存在，但这些神经支配以前存在的受体，可能由于肌细胞的内吞作用和降解作用大多数都消失了。那么，这些新受体的合成是怎样被调节的呢？受体怎样把肌膜上的合适区域作为靶标的呢？已证明，乙酰胆碱受体是在位于突触位点下面的细胞质区域中合成的，因为在那里发现有乙酰胆碱受体的 mRNA。但是，对于突触区域的其他分子组成成分是怎样合成的，怎样被传送到突触位点和怎样聚集的都了解甚少。显然，在一个接收成千上万不同类型突触连接的神经元中，这种机制是极其复杂的。

在中枢神经系统的神经元中，它们合成一些"一步到位"的突触结构，而不依赖于把已合成的蛋白质成分输送到突触的传送装置。被选择性地定位于这些神经元突触位点下面的多聚核糖体为这种局部的合成提供了一种潜在的细胞学机制，这种蛋白质合成装置特别靠近发育中的突触的下面。有关在神经元上有多少突触后位点被建立和被保留的问题将是今后研究的一个重要课题。

参考文献

1 Anderson D J, Axel R. A bipotential neuronendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids. Cell, 1987, 47: 1 079～1 090

2 Bronner－Fraser M. Analysis of early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK. Dev. Biol., 1986, 115: 44～55

3 Hamburger V. Cell death in the development of the lateral motor column of the chick embryo. J. Comp. Neurol., 1975, 160: 535～546

4 Jacobson A G, Oster G F, Odell G M, *et al*. Neurulation and the cortical tractor model for epithelial folding. J. Embryol. Exp. Morphol., 1986, 96: 19～49

5 Kalcheim C R, Neufeld G. Expression of basic fibroblast growth factor in the nervous system of early avian embryos. Development, 1990, 109: 203～215

6 Klose M, Bentley D. Transient pioneer neurons are essential for formation of an embryonic peripheral nerve. Science, 1989, 245: 982～984

7 Levi－Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. Science, 1987, 237: 1 154～1 162

8 Loring J F, Erickson C A. Neural crest cell migratory pathways in the trunk of chick embryo. Dev. Biol., 1987, 121: 220～236

9 Perris R, Lofberg J, Fallstrom C, *et al*. Structural and compositional divergencies in the extracellular matrix encountered by neural crest cells in the White mutant axolotl embryo. Development, 1990, 109: 533～551

10 Rakic P, Goldman P S. Development and modifiability of the cerebral cortex. Neurosci. Rev., 1982, 20: 429～611

11 Serbedzija G N, Bronner－Fraser M, Fraser S E. A vital dye analysis of the timing and pathways of avian trunk neural crest cell migration. Development, 1989, 106: 809～816

12 Sidman R L, Miale I L, Feder N. Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. Exp. Neurol., 1959, 1:322~333

13 Turner D L, Cepko C L. A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. Nature, 1987, 328:131~136

14 Vogel K S, Weston J A. The sympathoadrenal lineage in avian embryos. II. Effects of glucocorticoids on cultured neural crest cells. Dev. Biol., 1990, 139:13~23

第十一章　附肢的发育和再生

脊椎动物，特别是鸟类和两栖类附肢的发育包含了大量、各种各样诱导的相互作用。另外，由于在幼体期两栖类的附肢损伤后能够再生，特别是有尾类的蝾螈和美西螈在成体期仍能再生出完整的附肢，因此对附肢的发育和再生的研究成为发育生物学的一个重要课题，而对附肢发育模式形成的研究更远远超过附肢发育本身的研究。

第一节　脊椎动物附肢的发育

脊椎动物的附肢(limb)是一个极其复杂的器官，它具有许多不对称的部分。虽然脊椎动物的附肢都是由体壁中胚层和外部的表皮共同形成的，但它们的最后形式却各不相同。如前肢可成为前足、上肢、翅、鳍等。前肢的骨是由最近(靠近体壁)的肱骨、中部的一块桡骨和一块尺骨、腕骨和远端的指(趾)骨组成。起初这些结构都是软骨，最后大多数软骨被骨代替。在附肢中每一块骨和肌肉的位置都被精密地组织在一起。前肢中存在的三维极性模式示如图 11.1。虽然附肢在这三个基本轴上是不对称的，但左前肢总是与右前肢呈镜面对称。

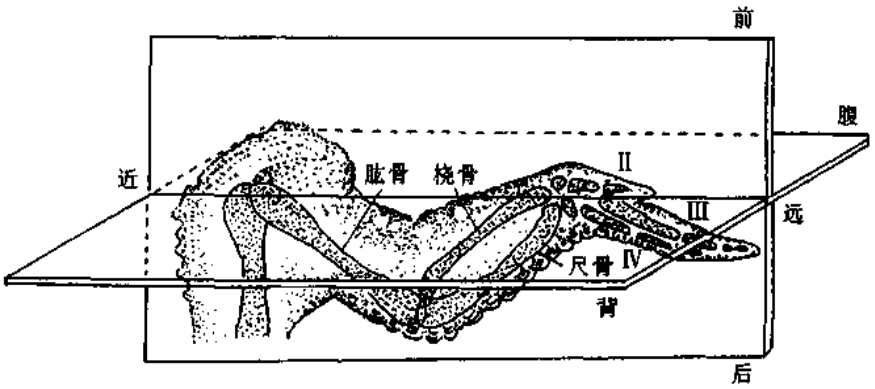


图 11.1　鸡胚右翼背面观

脊椎动物附肢基本的三个轴及其不对称性。指骨被排序为Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ，指骨Ⅰ和Ⅴ在鸡翅中缺如

一、附肢的起源

脊椎动物的附肢在起源上是由胚胎体壁向外生长形成的，主要是由来自侧板中胚层的体节部分和体节腹侧部产生的疏松间质形成的中央核，以及位于外部的，来自外胚层的表皮两大部分组成。附肢的原基称为附肢芽(limb bud)。附肢的基本成分(骨骼、肌肉和结缔组织)是由中胚层形

成的，产生脊椎动物附肢的中胚层细胞可通过不同的实验方式进行鉴别：①除去一组细胞，并观察在缺少它们的情况下附肢是否发育；②移植一组细胞到一个新的位置，观察它们是否形成一个新的附肢；③用染料或放射性前体标记一组细胞，观察被标记细胞的后代参与附肢发育的情况。通过以上不同的实验，许多脊椎动物胚胎中的预定附肢区(prospective limb area)已被定位，图 11.2 示一个蝾螈(*Ambystoma maculatum*)尾芽期胚胎的预定前肢域。这个盘的中央部分标记出侧板中胚层细胞，通常它指定产生附肢本身。与其邻近的细胞是那些将形成周围的躯干组织和肩带的细胞。这两个区域通常包括了经典的附肢盘(limb disc)。

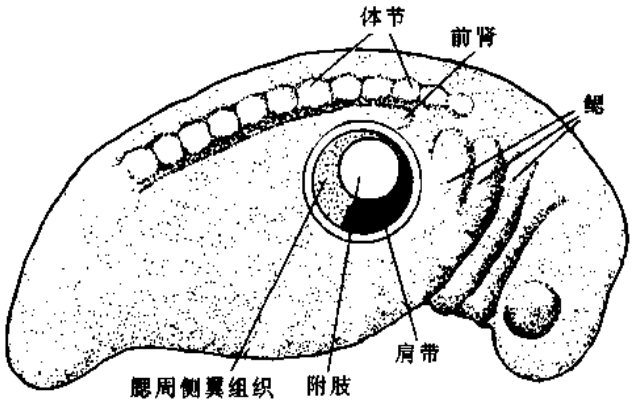


图 11.2　美西螈(*Ambystoma maculatum*)的预定前肢场

中央区含有将发育形成游离前肢的细胞。围绕着游离前肢的细胞是那些将产生周围的躯干组织和肩带的细胞。在这些区域外边的细胞通常并不包括在前肢中，但如果将中央的组织除去时，它能调节形成前肢

实验证明，如果将中央的“附肢盘”区除去，将由围绕此区的其他细胞形成附肢。如果将周围的细胞一起除去，将没有附肢的发育。这个大区包括了能形成一个附肢的所有细胞，称为附肢场(limb field)。在这个场中细胞的位置和命运被特化为具有相同的边界。

附肢场起初具有调节失去或增加部分附肢的能力。在尾芽期的美西螈中，任何半个附肢盘被移植到一个新的位置时，都能再生出整个附肢。这种潜能在下述实验中得到证明：当垂直地将附肢盘分成两半或更多的部分后，用薄的障碍物放在它们之间以防止彼此重新愈合，结果被分隔的每一部分都能发育成一个完整的附肢。因此认为附肢场可能代表一个“调和等能系统”(harmonious equipotential system)，其中的每个细胞都能被指令形成附肢的任一部分。

二、附肢的早期发育

附肢早期发育的第一个迹象是体节中胚层细胞沿胚胎长轴的增殖，逐渐在表皮的下面形成厚的细胞团。这个增厚部分的细胞从附肢场的侧板中胚层(附肢骨骼的前体)和体节中胚层(附肢的肌肉前体)分离出来，并转变成一团间质细胞。这些间质细胞向侧面迁移到侧板中胚层和表皮之间，很快就牢固地贴附于表皮的内表面(图 11.3)。实验证明，细胞增殖的起始阶段好像受附近中肾的调节。当除去一侧的中肾或将一不透性膜插入中肾和附肢芽之间时，这一侧的附肢芽中的细胞停止分裂，附肢不能生长。

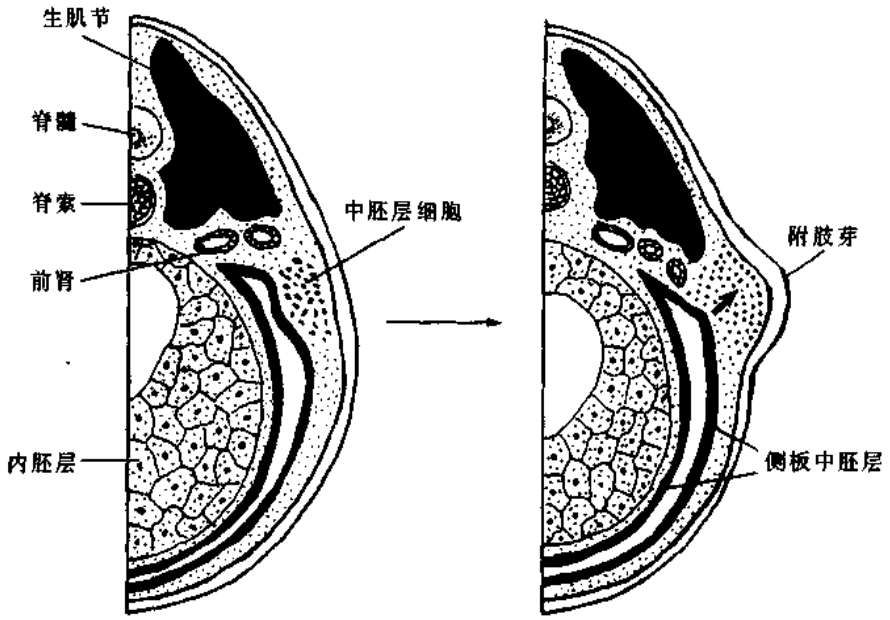


图 11.3 两栖类胚胎中附肢由中胚层起源的图解

侧板中胚层的增厚和随后在表皮下面一团间质的形成可能与两对附肢的位置紧密相关。在两栖类中，它们出现于两个相隔的区域，即在鳃区的后面和肛门的前面。在其他脊椎动物中，这种增厚和间质的聚集可能扩展远远超出附肢发育的实际区域。在鱼类发育早期的附肢原基比发育晚期的沿前后轴伸展的更长。在羊膜动物中，这种增厚和间质的聚集沿身体的整个长度形成一条纵行的嵴，称为乌尔夫氏嵴(Wolffian ridge)。此嵴的最前部分(位于胸腔)和最后部分(位于骨盆)比中间部分厚一些，只有前、后两处的增厚部分逐渐发育为前肢和后肢。乌尔夫氏嵴的中间部分此后消失。这些增厚的部分是由于细胞在此区域比在其他区域较迅速的增殖。

覆盖在间质细胞团表面的表皮变得稍微增厚并向外突出。这个包含有覆盖在外面的增厚的上皮和被包裹在内部的间质细胞团的突出物增大并变为肢芽(limb bud)。在鸟类和哺乳类中胚层诱导肢芽顶端前、后边缘的外胚层细胞伸长，形成一个增厚的特殊结构，称为顶外胚层嵴(apical ectodermal ridge，AER；图 11.4)。AER 发现于多数较高等的脊椎动物，包括哺乳动物，但并不存在于有尾两栖类中。AER 对附肢的继续向外生长是至关重要的，但它是一个临时的结构，在鸡胚中，当第 8 天指形成时就消失。

附肢芽在顶端通过未分化的间质细胞的持续增殖而伸长。这个增殖的区域首先通过形态学的标准被鉴别出来，它是一个厚约 250 μm 和由未分化的细胞组成的。但对其精确的大小现在仍有争议。然而，在附肢伸展期间那些更近体侧的顶端细胞显示出减弱了的有丝分裂能力，它们开始聚集在附肢的中心，形成软骨性成分，最后产生附肢的骨骼。骨骼成分的分化是以一种近－远的方向进行的：在鸡翅中第一个出现的软骨是肱骨，然后是桡骨和尺骨，最后是腕骨和指骨。与此同时，预定肌细胞前体聚集在软骨周围以形成肌肉群体。

1．附肢发育中外胚层和中胚层间的相互作用

附肢芽的中胚层和外胚层能用化学方法很干净地分离，因此 AER 在鸡胚附肢发育中的作用得到深入广泛的研究。用胰蛋白酶溶液处理附肢芽，引起中央的间质分离。虽然在处理后中胚层

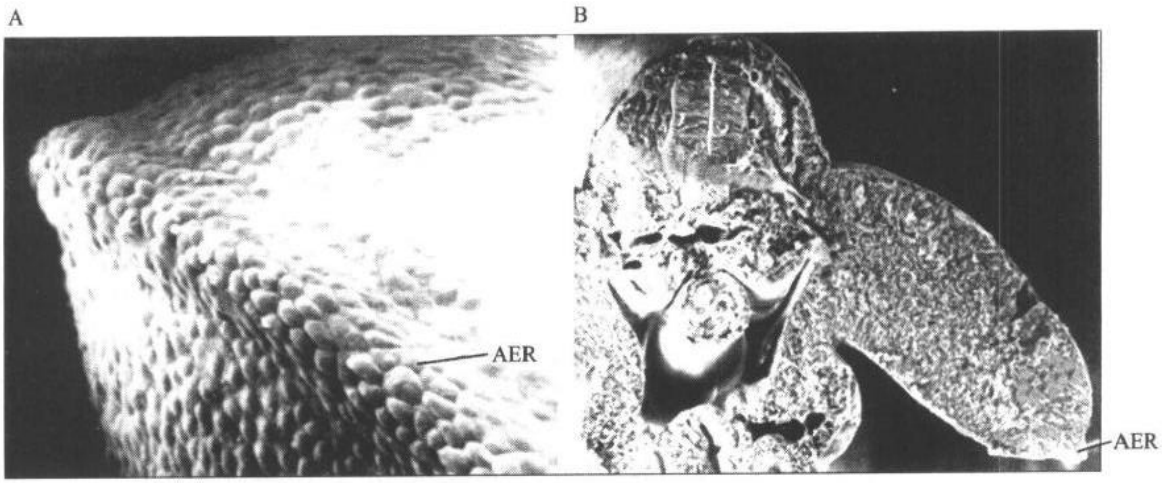


图 11.4　顶外胚层嵴(AER)

A. 鸡早期具有 AER 的前肢扫描电镜照片　B. 4 天鸡胚过肢芽的扫描电镜照片,在肢芽远端可见 AER

不能完整地获得，但表皮是相当健康和完整的，它可用于覆盖另一个附肢芽除去表皮后剩余的中胚层部分。后者是通过将附肢芽浸泡于维尔烯(Versene，乙烯二硝基四乙酸商品名)溶液中，将外胚层破坏使之成片地脱落下来，而剩余的中胚层处于极好的状态。

附肢的向外生长涉及 AER 和中胚层间持续的相互作用。AER 的存在对位于其下方的顶端中胚层的持续增殖是必需的。如果切除三天鸡胚翅芽的 AER，则 AER 不能再生，其下面的中胚层细胞停止分裂。虽然附肢的近侧部分能正常发育，但其远侧部分不能形成。如果用身体其他部分的表皮代替鸡胚附肢芽切除的 AER，它能发育成一个 AER，但整个附肢远侧部分的发育受到抑制。其肩带可能发育正常，但其较近侧的肱骨或股骨变短。因此一旦中胚层诱导其上方的外胚层形成 AER，AER 对附肢的生长和与中胚层的相互作用是重要的(图 11.5)。

(1) 在附肢发育期间任何时间除去 AER，远端附肢的进一步发育停止。

(2) 当额外的 AER 移植到附肢芽将形成超数附肢结构，通常朝向附肢远端。

(3) 将腿间质直接置于翅的 AER 下方，远端的后肢结构(趾)在附肢末端发育(然而，如果腿间质离 AER 较远，后肢间质并入翅的结构)。

(4) 当非附肢的中胚层移植到 AER 下方，则 AER 退化，附肢发育停止。

此现象在两栖类胚胎中的情况有所不同，其头部或躯干部的外胚层参与附肢的发育，但在两栖类的附肢芽上没有 AER。在鸡胚中，如果将一个额外的 AER 移植到发育中的附肢芽的侧面，将形成一些附加的附肢成分。当一个 AER 与附肢的中胚层结合组织培养时，中胚层被诱导而增殖，而 AER 以外的任何附肢外胚层都不会对中胚层产生这样的影响。似乎 AER 释放一种信号，它刺激在相邻的间质中细胞的分裂形成渐进带(progress zone)。但这个输送到中胚层中的增殖信号的实质仍不清楚。

中胚层在附肢的发育中也起着关键的作用。AER 起初的形成和继续的存在依赖于位于其下方的中胚层。如果将预定附肢中胚层移植到躯干部外胚层下面，将形成一个 AER 和发育出一个额外的附肢。如果将早期鸡胚附肢芽的中胚层切除，然后将剩余的外胚层包裹非附肢的中胚层，则 AER 退化，中胚层停止增殖。在鸡胚中，翅的中胚层在 11 期(13 体节的胚胎，孵化 40～45 小

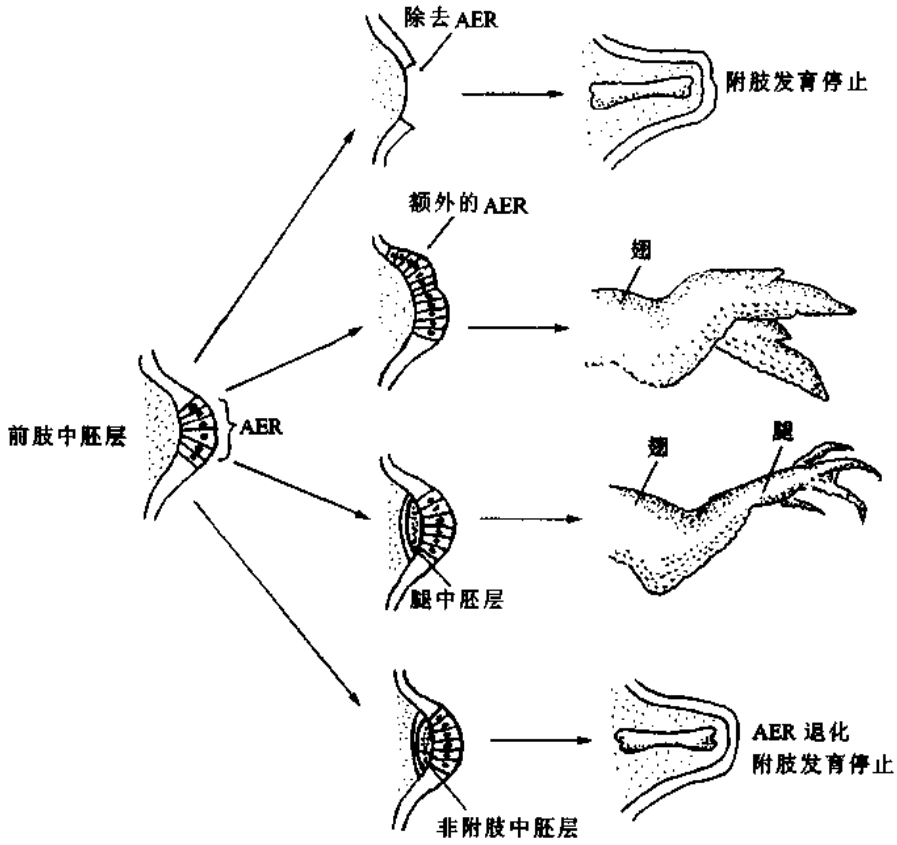


图 11.5　顶外胚层嵴(AER)通过位于下方的中胚层诱导作用的总括

时)获得这种诱导能力，到 17 期(31 体节，3 天)时丧失此能力，而腿的中胚层遵循同样的模式，但时期稍晚。在此期间，附肢芽的中胚层用取自不同来源的外胚层覆盖，二者紧密地粘贴在一起，这样组合的附肢芽可植入到第三个胚胎的躯干部，并在那里长出一个附肢。发育的附肢的结构是受中胚层指令的诱导作用决定的。

然而，在有尾两栖类中有所不同。附肢发育的潜能被证明存在于从前肢到后肢的整个躯干部，即使它的这种能力在正常发育中并未表现出来。通过移植一个耳泡或鼻原基到前肢和后肢之间的区域，可在那里诱导出额外的附肢(图 11.6)。这种移植物作为一种"异常的诱导者"激活了躯干部组织中潜在的能力。超数附肢(supernumerary limb)的诱导作用可能也存在于蝰蜍的胚胎中，但必须用头部前方的器官原基的复合体作为诱导者。在这种情况下，移植物的活性成分像在有尾类中一样是鼻原基，但也有口器原基。

尽管附肢的发育在鸟类和两栖类中存在一些不同，但从上述实验结果可以看出，附肢的中胚层依赖 AER 得以持续地增生，反之 AER 又依赖附肢中胚层保持其最初的形成和此后的存在。这些发现提示，中胚层产生一种负责 AER 存在和位置的因子，这种假定的物质已被命名为顶外胚层保持因子(apical ectodermal maintenance factor)。但这种物质现在还没有分离出来。

显然，从以上结果可以看出，在附肢发育中至少要求三种类型外胚层和中胚层间的相互作用：第一，中胚层起始附肢芽向外生长和形成 AER；第二，AER 刺激进一步向外生长及附肢芽中胚层的增殖和分化；第三，附肢芽中胚层提供保持 AER 所必须的刺激(图 11.7)。

一系列有关鸡突变体的实验进一步证实，在附肢发育中，中胚层和外胚层间相互作用的重要性。在一种无翅(wingless)的突变体中，正常的翅不能发育。在这些胚胎中可以看到在孵化3天时有正常的AER，但很快就退化。如果突变体附肢芽中胚层与野生型附肢芽外胚层相结合，AER同样退化。这表明此中胚层不能保持AER。相反，在另一种称为双倍(eudi plodia)的鸡突变体中，在背部发育出附加的附肢成分。组织学的检查发现，AER向背部扩展。如果将突变体的中胚层与正常的外胚层相结合，AER仍将扩展，产生一些额外的指。因此，中胚层能决定AER的存在和形状。

附肢发育的能力明显依赖于与相邻的体节板的连接，因为从非常年幼的胚胎取下的附肢中胚层只有在与其相连的体节板被同时移植到躯干部时，才能诱导出一个AER和形成一个附肢。

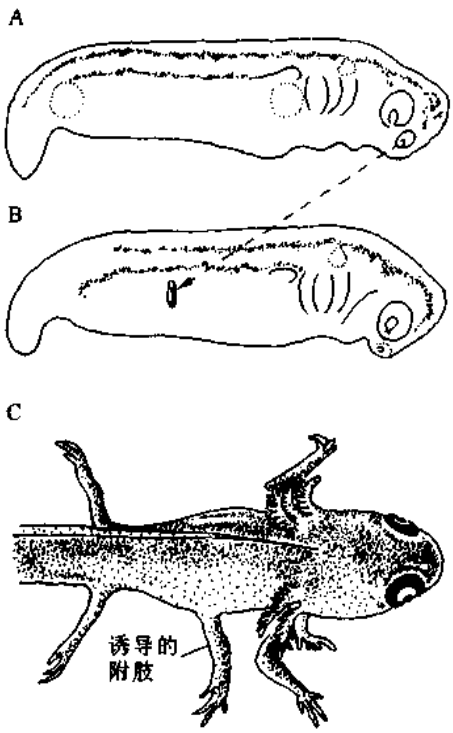


图11.6　在蝾螈(*Triturus taeniatus*)中移植的鼻原基诱导超数的附肢

A、B. 图解实验操作过程　C. 正常的前、后肢和诱导的超数附肢

2. 附肢发育时期轴的建立

脊椎动物完全形成的附肢包含三个轴的发育，分别是近－远(proximal－distal，P－D)轴、背－腹(dorsal－ventral，D－V)轴和前－后(anterior－posterior，A－P)轴，通常成对的附肢根据这三个轴呈镜面对称。通过一系列的移植实验证明，在附肢发育中三个轴的建立具有各自的时间性，它们好像是按照下列顺序决定的：前－后轴、背－腹轴和近－远轴。

(1) 近－远轴的发育

附肢沿近－远轴的分化是由AER和附肢中胚层诱导的相互作用产生的。附肢芽的逐渐向外

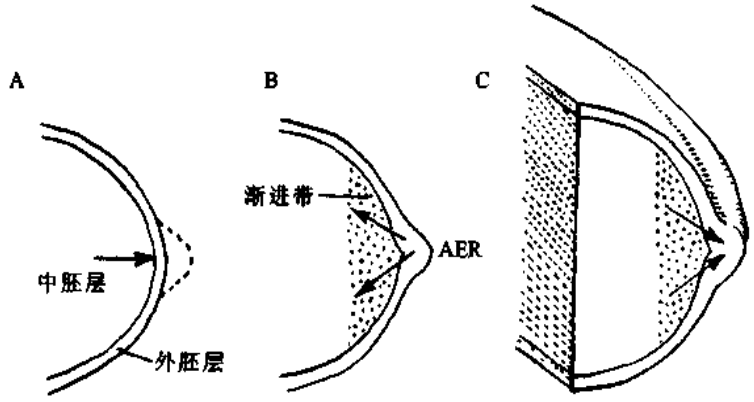


图11.7　在附肢发育期间发生于中胚层和外胚层间相互作用的图解

A. 中胚层诱导AER的形成　B. AER诱附肢渐进带内中胚层的生长和分化　C. 受诱导的中胚层产生顶外胚层嵴保持因子

生长是由于位于 AER 下面在渐进带内的间质细胞的增殖，现在认为由 AER 释放的分子维持间质细胞不断进行分裂。早期 Saunders 的实验证明，附肢中的骨骼成分是以近－远轴的方向建立的。因为如果连续地在较晚时期切除 AER(这将停止附肢的进一步向外生长)，则有越来越远的附肢成分在残肢上形成。如将 3 天鸡胚翅芽的 AER 切除，将只有肱骨在残肢上形成，如果在孵化第 4 天将鸡胚的 AER 切除，将有桡骨和尺骨(可能还有一些腕骨成分)在产生的附肢上分化(图 11.8)。

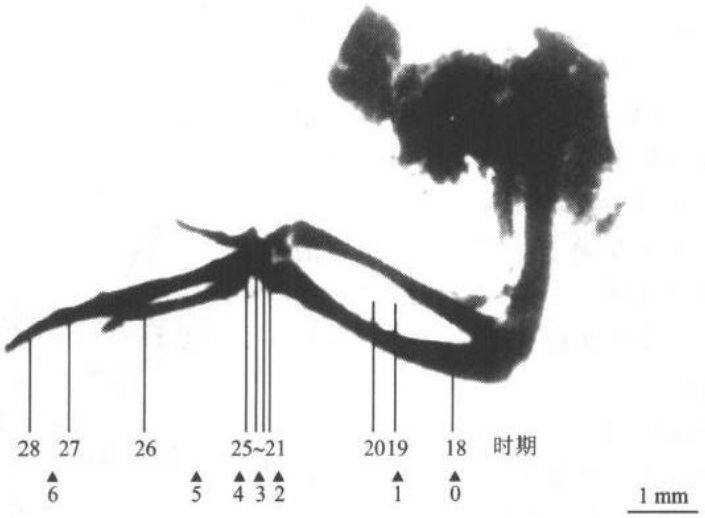


图 11.8 在附肢顶端被切除时，附肢的向外生长停止

截肢的时间越晚，则越远的附肢成分从断肢上发育出来。此图总结了在不同时期截肢以后形成哪些骨骼成分或骨骼成分的哪些部分。底部的数字表示在渐进带中细胞周期数

根据上述实验结果，Summerbell 等(1973)制定了在鸡胚附肢中近－远轴建立的下述模型。在附肢内中胚层细胞的命运是由它们在附肢顶端被称为渐进带的区域中保留多长时间决定的。渐进带是附肢顶端的一个增殖活动区，它最早被 Saunders 识别是处于 AER 的控制之下。渐进带的厚度在附肢向外生长期间保持不变，是 AER 影响有丝分裂活动的距离。他们假定，由于在渐进带中细胞持续增殖，那些首先被推离渐进带的细胞脱离开 AER 的影响，将形成附肢最近端的成分；而那些在渐进带保持较长时期的细胞将形成附肢较远端的成分。为了检验这个假说，切除一个非常年幼附肢的顶端，使保留的残肢包含以前特化为肱骨的部分，并将一个较老的 4 天鸡胚的翅顶端(它将具有较远端的附肢部分，腕骨和指骨)移植到断肢上。结果产生一个失去中间部分(桡骨和尺骨)的附肢(图 11.9A)。相反，当一个年幼附肢的顶部移植到一个较老的附肢断肢时，结合的附肢发育为具有加倍的中间部分(图 11.9B)。这些实验结果具有两个重要意义：①中胚层细胞一旦离开渐进带和脱离 AER 的影响，它们的命运就不可逆地被固定了；②一个细胞的位置信息是由它在 AER 影响下的时间长短决定的。

一个细胞在渐进带中经历的细胞分裂周期数决定它是变成远端或近端的成分。下述实验证据支持这个观点。当用 X 射线照射 3 天鸡胚，使大多数分裂中的细胞死亡。然后切除被照射鸡胚的渐进带，并移植到另一个未经照射的 3 天鸡胚的断肢上。在移植片中存活的那些细胞重新开始增殖，但因为在照射期间许多细胞已死亡，在渐进带恢复其正常的宽度以前必须经过数次分裂。这样当它们离开渐进带时，已经历了比正常情况下多的细胞分裂次数，因此可能将按程序地形成较远

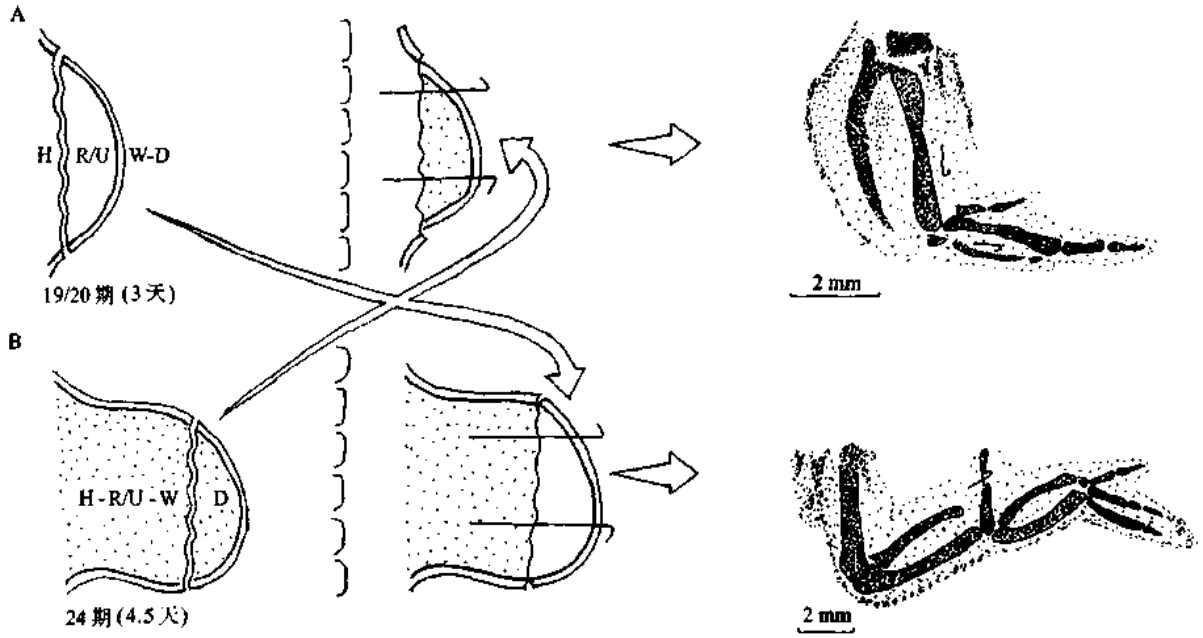


图 11.9　当"年幼的"和"较老的"附肢芽远侧顶端相互交换时，产生的翅极少或没有调节作用(右侧)

A. 当一个老的顶端移植到年幼的断肢上时，桡骨和尺骨缺失　B. 当将年幼的顶端移植到老的断肢上时，具有加倍的肱骨、桡骨和尺骨。这些实验结果支持一旦细胞从生长的顶端离开，其位置信息就固定了的假说

H. 肱骨　R/U. 桡骨/尺骨　W. 腕骨　D. 指骨

端的成分。事实上，在形成的附肢内中间的成分缺失。所以这些在渐进带中经历较多分裂次数的细胞确实像预期的那样，形成了较远端的结构。但是，另外一些实验资料对上述渐进带模型持有异议，因为至少一些实验结果提示在细胞离开渐进带以后其位置信息是可以改变的。如将中胚层或者从年幼的翅芽上切除，或者再给其附加一些组织(图 11.10)。为了识别受体和移植的组织，采用了鸡－鹌鹑嵌合体技术。当形成桡骨和尺骨的组织被切除时，至少部分新的桡骨和尺骨从断肢残桩上形成(即由应形成肱骨的细胞形成)。相反，当将附加的组织添加进来以便形成复合的附肢时，它应包含有加倍的肱骨和桡骨/尺骨，但却形成了一个相对正常的翅，它只形成一个大的肱骨，是由受体的肱骨和桡骨/尺骨组织和移植组织的肱骨细胞组成的。这些实验结果证明，位置信息并非是不可逆地被固定了的，因为确实存在一些调节作用。

虽然还不能完全解释这些实验结果间的分歧，但这种分歧可能部分地是由于进行移植时胚胎发育的时间。现在已经证明，当在年幼的胚胎(少于 3 或 4 天)附肢进行缺失的实验时，可能发生调节作用；而在较老的附肢(大于 3～4 天)进行实验时，位置信息变得固定了(图 11.11)。尽管存在上述分歧，但这将激励进一步进行深入研究，并可能最终阐明较高等脊椎动物附肢模式形成的机制。

那么起始 AER 与位于其下方渐进带间质相互作用的分子信号是什么？最近的研究证明，成纤维细胞生长因子－2(fibroblast growth factor 2，FGF－2)是在 AER 中合成的，并释放到其下方的间质中。另外，当除去 AER 后，植入的可释放 FGF－2 的念珠将代替 AER 的作用(图 11.12)。如果除去 2 天鸡胚翅芽的 AER，翅芽停止生长，只形成肱骨。当将曾浸入盐溶液中的念珠植入缺少 AER 肢芽的渐进带间质中，并不能使肢芽进一步生长或发育。然而当将曾浸入 FGF－2 中的念珠

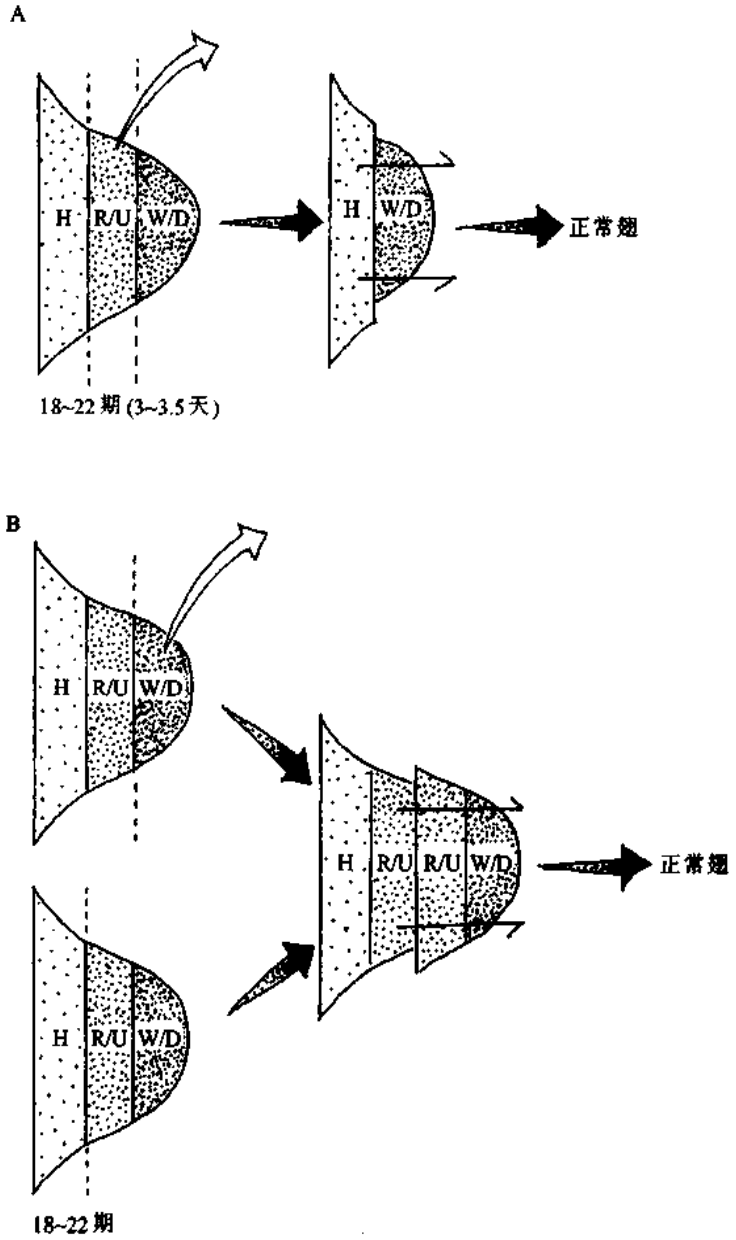


图 11.10　当重组的附肢中间部分或缺少(A)或是加倍(B)时，在附肢产生一些或全部的调节作用
这些结果与渐进带模型并不一致，在渐进带模型中一旦细胞离开渐进带其位置信息就固定了
H. 肱骨　　R/U. 桡骨/尺骨　　W/D. 腕骨/指骨

植入时，一个念珠就能使翅芽有稍微进一步的发育，形成肱骨、尺骨和桡骨。当念珠上的 FGF－2 耗尽时，在 24 小时后将含有 FGF－2 的第二个念珠植入渐进带间质中，能促进翅芽的完全生长，形成肱骨、尺骨、桡骨、掌骨和指骨。因此认为 FGF－2 可能是鸡胚中维持渐进带间质增殖的分子。FGF－4 在实验条件下也能代替 AER，但不清楚它是否是在鸡胚的 AER 中合成的。

(2) 背－腹轴的分化

背－腹轴分化的基础尚不清楚。然而，这个轴的极性在附肢发育的早期就已稳定地决定了，

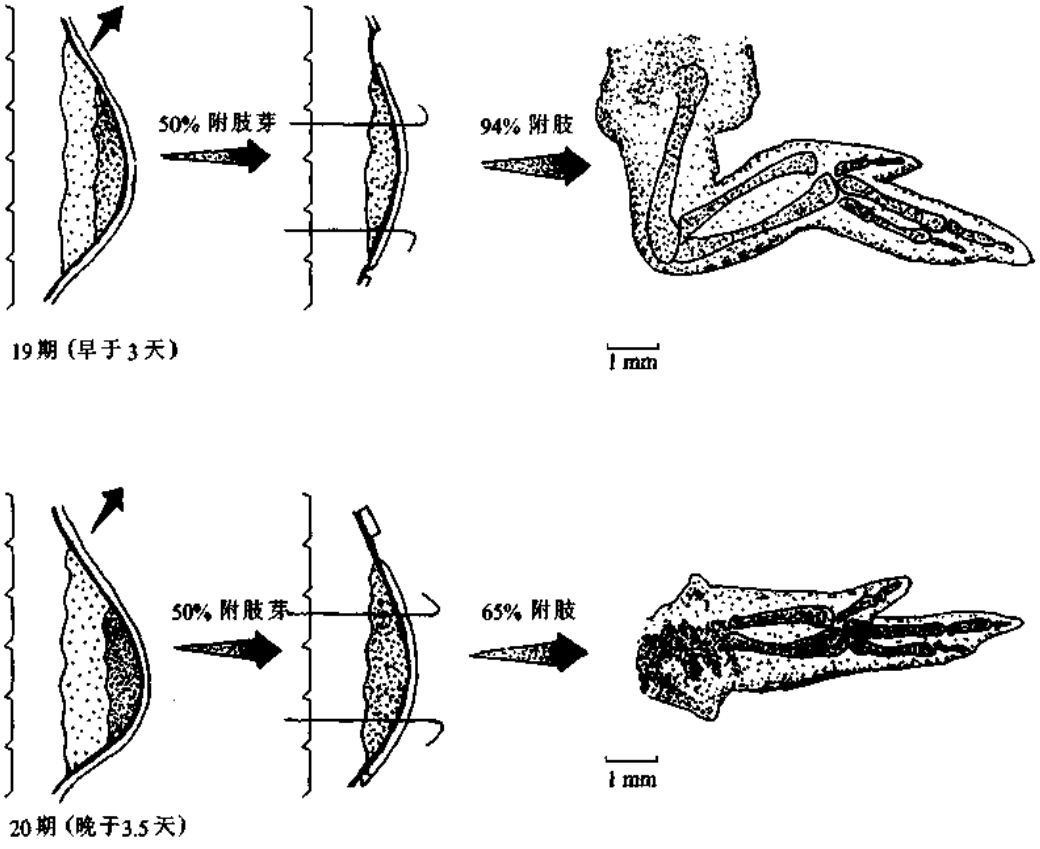


图 11.11　缺失实验中年龄的作用

A. 如果附肢的中间部分在 19 期胚胎（早于 3 天）被除去，产生一个正常的附肢，表现出明显的调节作用

B. 如果类似的切除实验在 20 期（晚于 3 天）附肢上进行，较少调节作用，附肢缺少中间部分（桡骨和尺骨）

而且它一般是不能通过实验的方法改变的。有关背－腹轴决定的研究工作与其他两个轴相比相对较少，但根据已做的工作可以看出，这个轴是被来自中胚层和外胚层二者的细胞特化的，虽然是处于发育的不同时期。当附肢芽的中胚层碎片被分离或离心地紧密组成的附肢芽细胞被包裹到一个 3～4 天翅芽的外胚层壳中，并将它移植到受体胚胎的躯干部，其附肢远端成分的骨骼和肌肉具有与外胚层一致的背－腹轴。类似的，如果 3～4 天鸡胚腿芽完整的中胚层内核与外胚层壳相结合，并使外胚层背－腹轴颠倒，则骨骼和肌肉的背－腹轴也颠倒。外胚层特化背－腹轴的能力可早于 50～53 小时的胚胎，甚至在 AER 出现以前。然而，早于这个时期，外胚层和中胚层结合产生的背－腹轴是根据中胚层的极性。另外，还没有可用的模型来解释背－腹轴的特化。含有 *homeobox* 的基因，*Engrailed－1* 在 AER 形成之前在附肢腹部的外胚层中特异地表达，有可能特化为将来的腹部区域。

（3）前－后轴的特化

发育的附肢芽的前－后轴的极性是在肢芽能识别之前就已特化。实验证明，早在 16 体节期预定翅中胚层移植到躯干区发育出具有供体移植片前－后和背－腹极性的附肢，而不是受体组织的极性（图 11.13）。

虽然近－远轴结构的分化被认为依赖于一个细胞在渐进带中经历了多少次细胞分裂，但指令

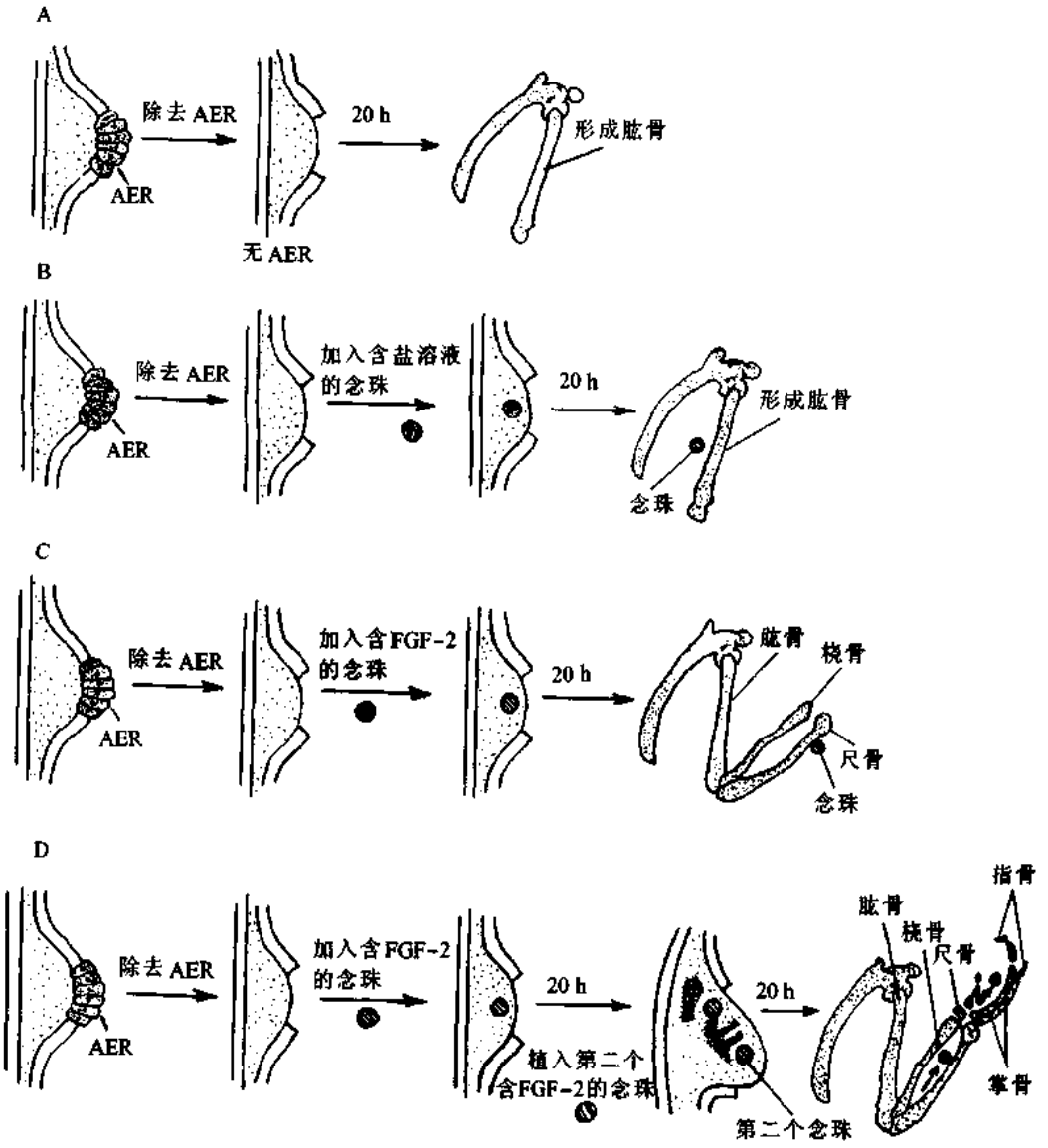


图 11.12 在发育的鸡胚翅芽中 FGF－2 代替 AER 的能力

A. 当除去 20 期鸡胚翅芽的 AER，只形成肱骨 B. 将曾浸入盐溶液中的凝胶念珠植入渐进带间质中，仍仅残肢发育，只形成肱骨 C. 当将曾浸入 FGF－2 的念珠植入渐进带间质，翅芽能继续生长，并形成尺骨和桡骨 D. 当第一个念珠的 FGF－2 几乎耗尽时，将第二个含 FGF－2 的念珠植入渐进带中，翅芽继续生长并进一步形成掌骨和指骨

细胞在前－后轴和背－腹轴位置的信息必定来自其他方面。一些实验认为，前－后轴是由年幼肢芽和体壁后部连接处的一小团中胚层细胞特化的。当年幼肢芽的这团组织被移植到另一肢芽前侧的位置时，形成翅内指的数目加倍(图 11.14)。另外，额外一组指的结构与正常发育指的结构呈镜面对称。极性被保持下来，但现在的信息来自前后两个方向。中胚层的这个区域被称为极化活动区(zone of polarizing activity，ZPA)。

在鸡胚翅芽和腿芽中 ZPA 的位置信号活动的分布和强度已绘成图谱(图 11.15)，极化活动在

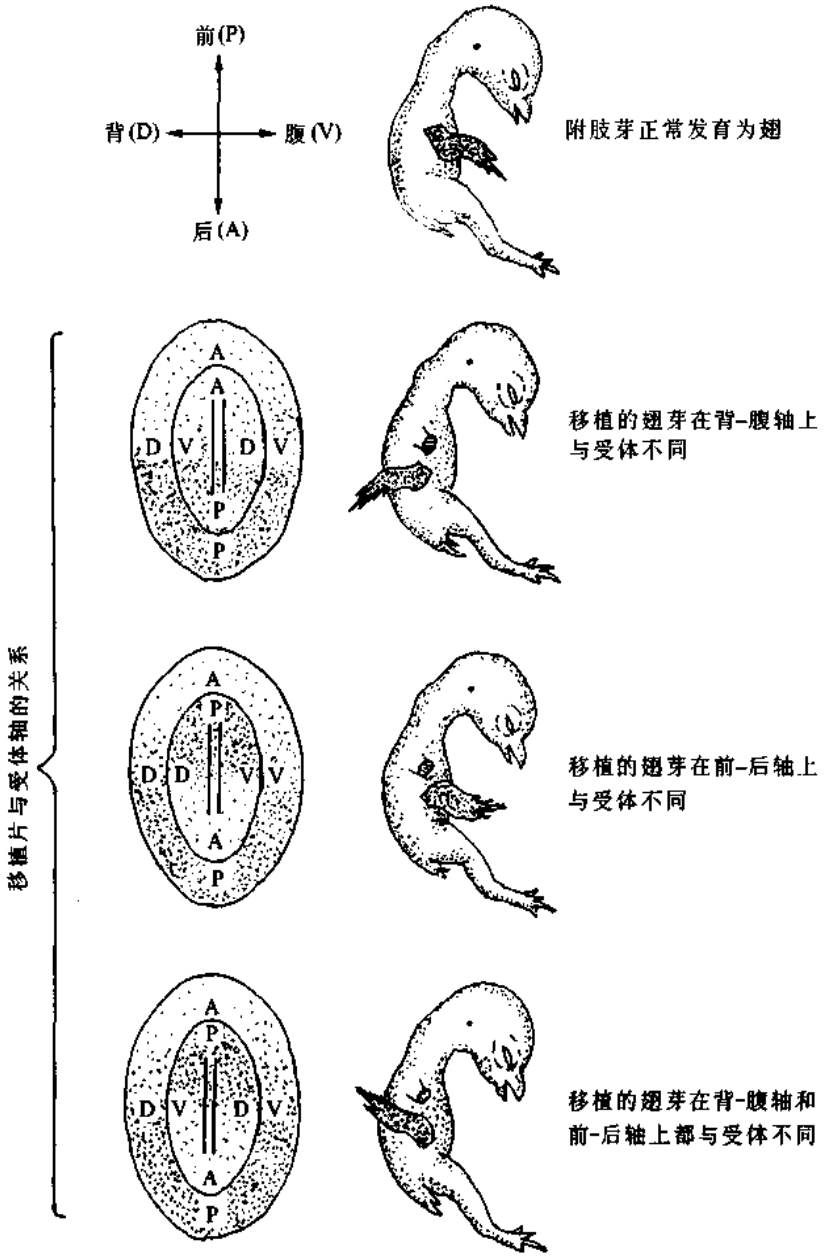


图 11.13　在鸡翅中前－后轴和背－腹轴的特化

肢芽后部边缘的特定区域最高，并由此向周围逐渐减弱。它随发育的进展变弱。

有两种主要模型用来解释前－后轴的特化。一种是 ZPA 可扩散形态发生子模型(ZPA diffusible morphogen model)，认为前后模式形成的机制是一种梯度：一群同源的细胞被指令通过一种可溶分子浓度的方式起作用。此模型认为 ZPA 组织通过分泌一种可溶性形态发生子起作用，此物质从 ZPA 向外扩散由肢芽后端向前端形成一种浓度梯度。因此那些靠近 ZPA 的细胞处于高浓度区，而较远的细胞处于相对低浓度区。这一假说得到一系列实验的支持，在实验中用不透性障碍物将肢芽前部和后部分隔开，则前部的结构不能形成。这被解释为 ZPA 分泌一种形态发生子在肢芽

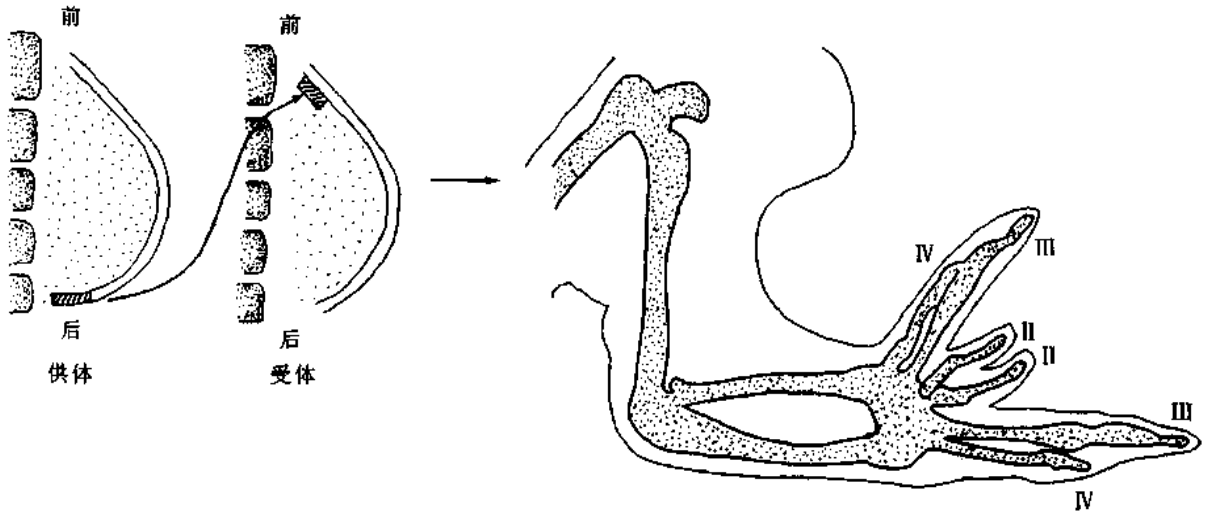


图 11.14 当 ZPA 被移植到肢芽中胚层前部时，加倍的指以正常指镜面成像的方式产生

图 11.15 随附肢发育绘出的位置信号图谱

肢芽的不同区域被切下并移植到前部边缘。100% 表示所有移植片显示完全的加倍(如图 11.13 所示)

中形成前后的梯度，前部结构不能形成是因为不能接收到形态发生子(图 11.16)。ZPA 极性活动由于从 ZPA 移植到前部边缘的细胞数量的减少而变弱。多年来视黄酸(retinoic acid)被认为是一种由 ZPA 分泌的内源形态发生子。在视黄酸中浸泡过的念珠能代替 ZPA，像 ZPA 一样诱导出镜面对称的颠倒的前－后轴极性。然而，近年的研究证明，ZPA 中视黄酸的含量似乎并没有高到足以激活对视黄酸敏感的基因的程度，因此在理论上视黄酸并不像是 ZPA 的活性成分。

另一种是极性坐标模型(the polar coordinate model)，此模型认为模式不是由可扩散分子形成的，而是由在细胞膜上固定的，是由可改变细胞特性的分子产生的。对附肢发育的研究证明，相邻细胞的表面对附肢前－后轴模式的形成至关重要。当将肢芽前部和后部的细胞并列时，产生的附肢具有超数的结构，常常具有二或三套指(趾)(图 11.17)。在附肢的再生过程中也是如此。通过比较大量附肢发育和再生实验的结果提出极性坐标模型，认为每个细胞具有一个圆周值(从 0 到 12)和一个辐射值(从 A 到 E)，并用此解释在发育和再生的附肢中前－后轴模式的形成(见附肢再生一节)。

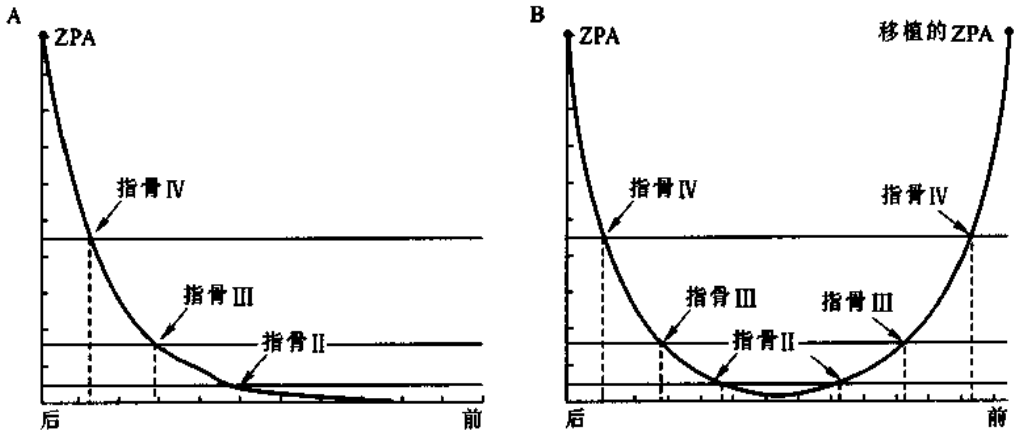


图 11.16　由 ZPA 组织分泌的一种可扩散形态发生因子的模型

A. 正常附肢的 ZPA 中产生一种可扩散成分，其梯度由后向前降低，当降低到一定阈值水平时，它组织细胞形成特定的指。后指是Ⅳ，前指是Ⅱ　　B. 当一个额外的 ZPA 置于附肢芽的前部，假定的形态发生因子的浓度发生变化，建立一种形态发生因子对称的分布，阈值的状况仍然适用，结果形成对称的加倍指

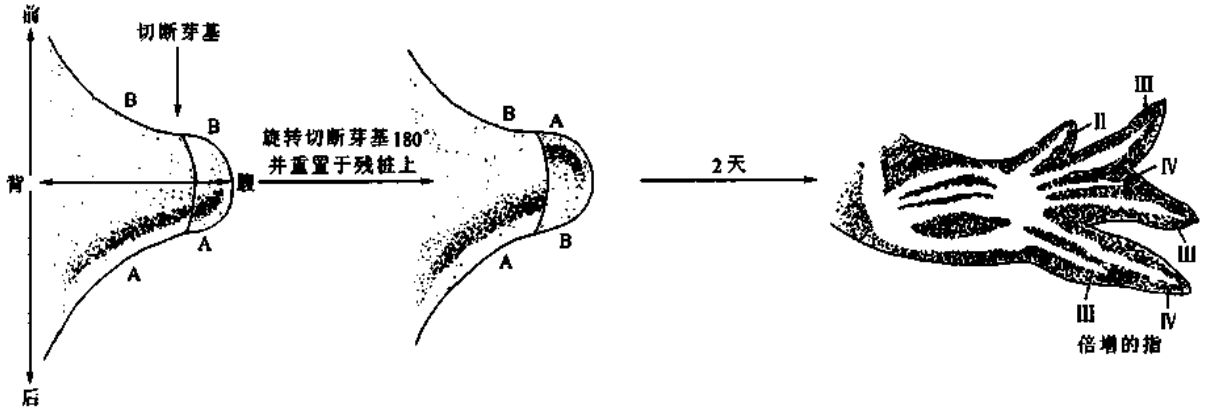


图 11.17　肢芽的反转实验

当将新生的肢芽从基部切下并旋转 180°再接到残桩上，产生的附肢具有三个向外生长的区域。在此例中，继续生长形成一块尺骨和一块桡骨，并在二者间形成两块新的尺骨。在它们顶端是代表三部分翅的指

3. 附肢中组织类型的建立

前面讨论的有关附肢主要的三个轴建立的模型是否适用于解释附肢中特殊细胞类型的分化？现代研究资料提示，根据附肢中的线索进行的细胞分化不同于决定位置信息的线索。起初，当附肢芽向外生长时，它是由形态学上同源的间质组成的。

鸡胚 26 期(5 天)在附肢中形成明显区别的形态学区域(图 11.18)。中央的核变得浓缩，被富含血管的层所包围。血管层向外是无血管的区域(avascular sleeve)，宽约 150 μm。中央的核区细胞最后分化为软骨，在外胚层下面的无血管区变为结缔组织，皮肤的真皮和血管区周围的肌肉群。

一些体外的(*in vitro*)实验证实，附肢芽细胞位于附肢芽内以后是多潜能的。当从附肢芽核心取出细胞进行培养，就全部分化为软骨细胞。当直接从位于外胚层下面的无血管区取出细胞并培养时，最初也发育为软骨细胞，虽然在胚胎内从不这样发育。对此应如何解释呢？似乎有可能附

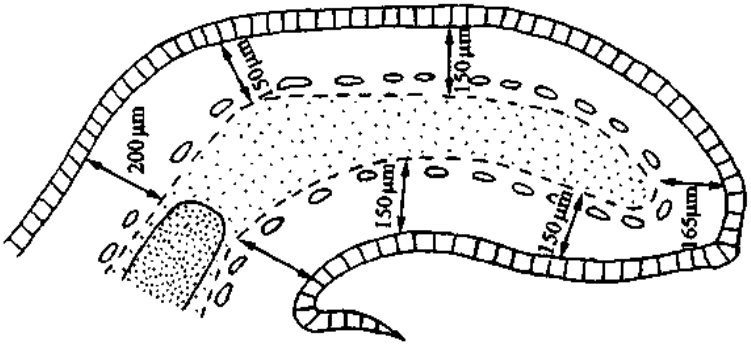


图 11.18 4.5 天鸡胚翅芽纵切面示其中细胞类型的分类情况

肢的外胚层对附肢成分的细胞分化施加一种负的(negative)控制。如果将预定软骨细胞与附肢外胚层共同培养，软骨很少分化。中胚层的行为好像是外胚层分泌一种可扩散的因子，抑制它分化为软骨细胞，因为这种抑制软骨分化的能力可通过一个多孔滤膜传播。有趣的是，这个因子不能扩散穿越 150 μm 或更厚的滤膜，这正是在胚胎的附肢芽中没有软骨发生的无血管区。

这种可扩散的软骨形成因子，被认为通过它起初对细胞形状的影响效力影响附肢内细胞的分化。在培养中，软骨的分化可通过使细胞更圆一些而加快。当防止细胞变圆时(将它们放置在像纤维粘连蛋白那样的粘连物质上时)，软骨细胞将不分化。一种现代假说认为，由外胚层产生的一些细胞外基质成分在外胚层下 150 μm 厚的无血管区中引起细胞变平，所以抑制软骨的发育。

有人认为，在附肢芽核心附近形成的血管层，当不处于外胚层的影响下时将发育，因为植入的外胚层产生一个围绕它的无血管区。这可能是由于透明质酸的积累，在无血管区以高浓度存在，而且当植入透明质酸时，将刺激一个无血管区的形成。

在血管层发育的肌肉形成区完全是由另一个组织，体节的真皮生肌节来源的。在鸡胚中，生肌的前体在 14 期(22 体节，孵化 50～53 小时)后迁移到附肢芽中。如果将鹌鹑的体节移植到一个鸡的受体中，并使嵌合的胚胎继续发育，则可追踪这种迁移(图 11.19)。两种来源的细胞可通过用 Feulgen 染色程序的核染色方式进行区别。一旦成肌前体进入附肢，很快就与血管层集中在一起。有人已假定，血管层或通过起一种迁移基质的作用，或通过产生一种向化因子，引导成肌前体的迁移。此后，肌细胞分别进入附肢背，腹两侧的肌肉群。附肢肌肉精确的模式形成依赖于软骨模型，它明显地建立一种为肌细胞遵循的模式。这个结论是基于下述实验观察：如果正常应产生翅肌肉的体节被移植到相对的腿芽基的区域，这些被移植的细胞将聚集在腿中，并发育成正常腿的肌肉。因此，肌细胞直到到达附肢和接受局部的信息后才了解它们将采取那种模式。

4. 同源基因在附肢发育中的作用

在附肢发育中明确了形态发生中的许多基本问题，而现代研究认为附肢是通过特异基因在特定细胞中的表达决定的。大量研究表明，同源基因可用于解释附肢发育中的所有主要现象。

(1) 同源基因决定附肢域

附肢域(limb field)的边界与诱导能力相关，而此边界是由同源基因的表达模式决定的。如爪蟾中胚层的前肢域完全位于一条细的细胞带中，这些细胞的核表达 XIHbox1(Hoxc－6)蛋白质。如果用 XIHbox1 蛋白质的抗体染色 19 小时斑马鱼的胚胎，可观察到在侧板中胚层中一个圆形的区域，并可在整个胚胎发育中追踪这个圆片，发现它与前肢(胸鳍)域一致。

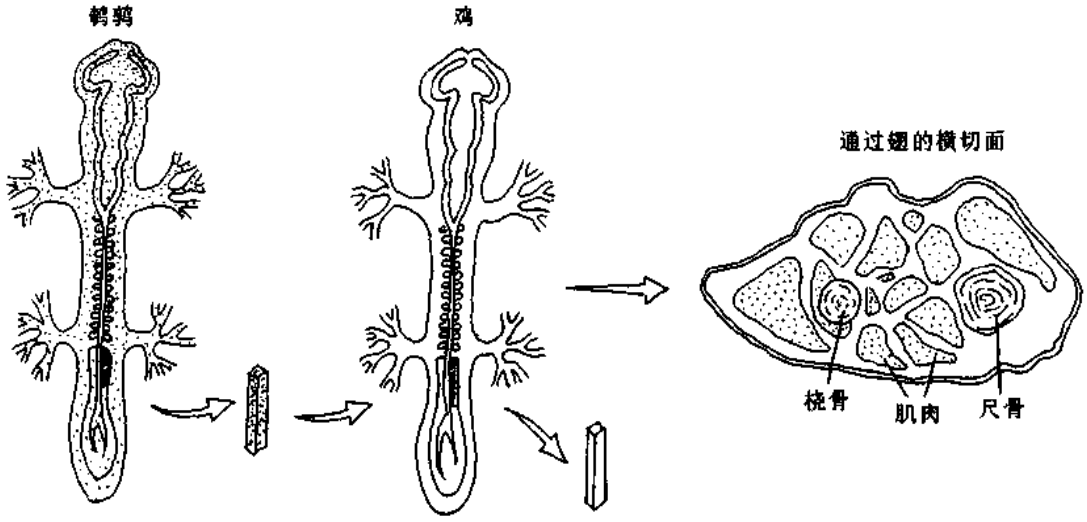


图 11.19　当鸡胚中靠近前肢芽的轴旁中胚层被鹌鹑的中胚层代替时，鹌鹑细胞只发现于翅的肌组织，而在相邻的结缔组织中没有

(2) 渐进带的相互作用是由 *msx－1* 和 *msx－2* 基因调节的

顶外胚层嵴和位于其下的间质的相互作用好像部分地是由 *msx－1* 和 *msx－2* 基因产物调节的。这些基因与同源的果蝇基因，*muscle segment homeobox* (*msh*)相关。*msx－1* 基因起初在整个早期的附肢芽中表达，但此后变得局限于直接位于 AER 下方的渐进带间质中表达。在缺少 AER 的无肢(*limbless*)突变体中，间质中不能诱导产生 *msx－1* 的信使；而在 AER 跨越边界的多指(polydactylous)附肢芽中，在 AER 下方广泛的区域中转录 *msx－1* 基因(图 11.20)。在 *eudiplopodia* 突变体中有两个 AER 形成，每个都产生一个附肢轴，可以发现在每个 AER 下面 *msx－1* 基因的表达。在实验条件下，除去 AER 可引起 *msx－1* 表达的停止，而增加 AER(即使将小鼠的 AER 附加到鸡的附肢芽)可引起 AER 下方间质中 *msx－1* 的表达和指导形成次级附肢轴。因此好像是由于对来自 AER 的信号起反应，在间质中诱导产生 *msx－1* 的表达。因为 *msx－1* 可能编码一个转录因子，这种蛋白质可能对维持这群细胞增殖是至关重要的。当生肌细胞用活跃转录的 *msx－1* 基因转染时，它们失去已分化的表型，在不需要将来的生长因子的情况下分裂增殖。AER 保持直接在其下方存在一个细胞增殖带的能力对附肢的发育是极其重要的，而 *msx－1* 可能在附肢发

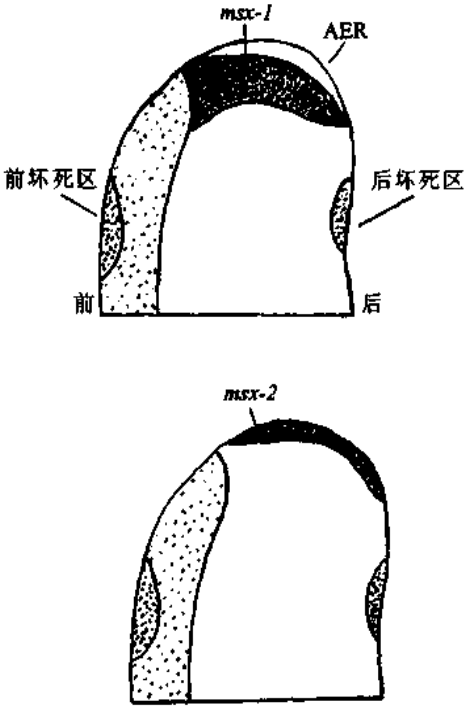


图 11.20　在正常鸡翅芽中 *msx－1* 和 *msx－2* 基因的表达

msx－1 的 mRNA 起初发现于 AER 下面的远端间质中，但也发现在附肢芽的前部和其细胞将死亡的前后坏死区。*msx－2* 的 mRNA 表达模式除主要分布于 AER 中外，其他类似于 *msx－1* 的

育中提供这种关键的作用。

虽然 *msx - 1* 是在渐进带间质中表达，*msx - 2* 基因起初是在 AER 和前部的间质中表达。在产生多倍附肢的突变体中，*msx - 2* 基因的表达遍及整个 AER 并脱离前部的 AER。如图 11.20 所示，在附肢基质中有其他无软骨形成区，两个基因在此都表达，但这可能并不涉及近 - 远轴。

(3) 由同源基因决定前 - 后轴和指的特性

在 20 世纪 70 年代的研究表明，附肢中的位置信息能特化指的数目，它独立于特化指的类型的信息。当分离出发育中附肢的间质，然后用其外胚层壳将它重新包裹，所以搅乱了间质中的前后信息。重组的附肢芽能形成附肢样的结构，但它们的指缺少任何可识别的特性。

近年的研究证明，*Hox - D* 基因族(*Hoxd - 9* 到 *Hoxd - 13*)5′末端的表达模式在小鼠附肢芽的后部边缘是重叠的。这意味着在后部边缘产生小指的细胞表达所有这些基因，而在前部边缘形成拇指的细胞只表达 *Hoxd - 9*(图 11.21)。*Hox - D* 信使的同样分布也见于鸡的附肢芽中。然而移植 ZPA 或含有视黄酸的念珠到附肢芽前缘导致镜面对称指模式的形成和镜面对称的 *Hox - D* 基因表达模式。那么，显然在不同 *Hox - D* 基因的表达中存在一个编码(code)特化前后指的模式。

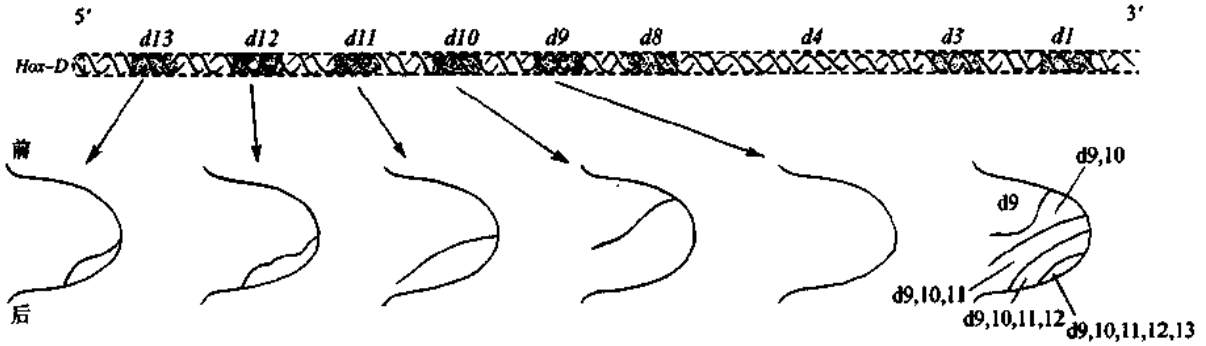


图 11.21 在发育中鸡的附肢芽中 *Hox - D* 基因序列的表达

附肢芽的最后部完全表达从 *Hoxd - 9* 到 *Hoxd - 13*。随着组织变得向前，*Hox* 基因的表达以在染色体上出现的顺序减少，所以前部的结构只表达这个序列中的 *Hoxd - 9*

然而这样的实验并不能说明新的 *Hox - D* 表达模式是细胞命运变化的结果而不是其原因。

像证实脊椎动物体轴中前 - 后特化的一个 *Hox* 密码的实验一样，我们必须“改变此密码”，然后观察是否发生指特性的转变。当用带有活动的 *Hoxd - 11* 基因还原病毒(retrovirus)转染胚胎，这样 *Hoxd - 11* 基因将在整个体内表达，包括前肢芽区(“大拇指”)，而通常此区这个基因并不表达(图 11.22)。在这些 *Hoxd - 11* 转染的幼鸡中，最前边的第一趾显示第二趾的特性。这些幼鸡具有两个第二趾，而不是一个第一趾和一个第二趾。在前部区中改变 *Hox - D* 基因的组合引起表现型的后端化(posteriorization)。对天然鸡附肢突变体(*talpid*；ta^3)的研究证明，鸡这种突变体等位基因的纯合子具有许多前 - 后轴的缺陷以及多指的翅，其指缺少明显的前后特化。这些附肢中 *Hox - D* 基因在整个附肢芽中表达，这种 *Hox - D* 极性的缺失与无指的特化相关。最近的研究证明，*Hoxd - 13* 能被一种假定的 ZPA 因子，声刺猬(sonic hedgehog)诱导。这些实验提供了 *Hox* 密码存在的证据，这个密码特化脊椎动物附肢的前 - 后轴并赋予每个指所特有的性质。*Hox - D* 基因的表达只能提供部分所需的特性，胫骨和大趾都是前部的成分，它们必须相互区别。因此毫不惊奇在附肢芽中，其他 *Hox* 基因也是活动的，它与 *Hox - D* 基因组呈不同的角度，具有自己的表达

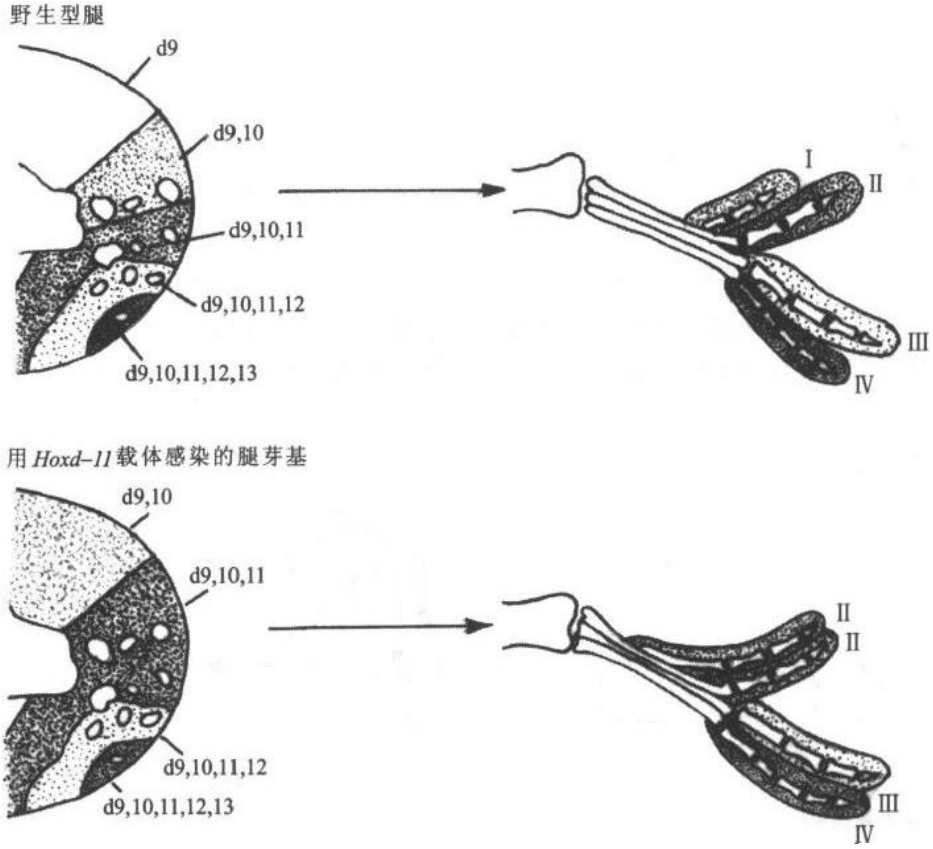


图 11.22　与个体指的特化相对应的 *Hox－D* 基因表达的模式

当 *Hox－D* 基因表达模式改变，如所有细胞表达 *Hox－11*，前肢(位于只表达 *Hox－9* 的区域，但现在处于正在表达 *Hox－9* 和 *d－11* 的区域中)被重新特化为第二肢

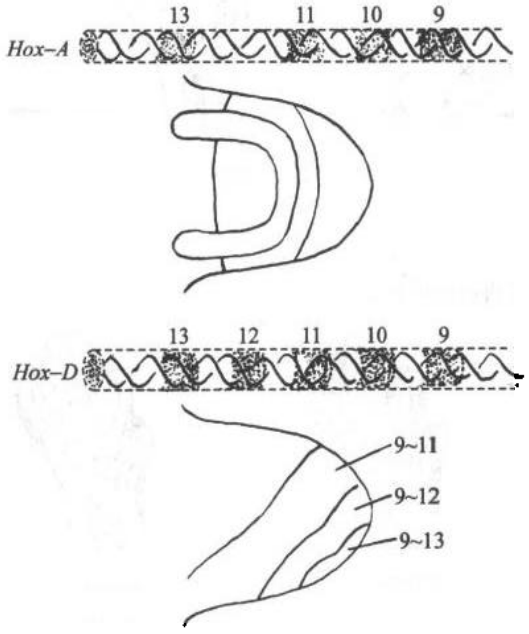


图 11.23　*Hox－D* 基因相互套叠的表达模式与 *Hox－A* 基因相互套叠的表达模式建立在不同的角度

在相对晚期(25 期)的附肢芽中类似的基因在稍微不同的细胞群中表达，这能区别不同的细胞类群

模式(图 11.23)。像 *Hox* - *D* 基因一样,最靠近 5′端的 *Hox* - *A* 基因只在附肢芽远端边缘是活动的,其他的 *Hox* - *A* 基因在较近处表达。*Hox* - *D* 的表达模式是彼此区别指,而 *Hox* - *A* 基因的表达模式是区别附肢的腕区和长骨区。

(4) 细胞死亡和同源基因

细胞死亡在塑造附肢中也起一种作用,它对于关节的形成和分离指都是必须的。在脊椎动物附肢的特定细胞中死亡通常是程序化的,是在长期的进化中选择的。这样的例子是足上有蹼或无蹼。鸭足和鸡足的不同是在指间有无细胞死亡(图 11.24)。研究证明在某一时期之后鸡趾软骨之间的细胞注定要死亡,即使将它移植到胚胎的其他区域或置于体外培养也将如此。然而在这个时期之前将它移植到鸭的附肢中将能存活。在细胞死亡被决定和死亡真正发生之间的时期DNA、

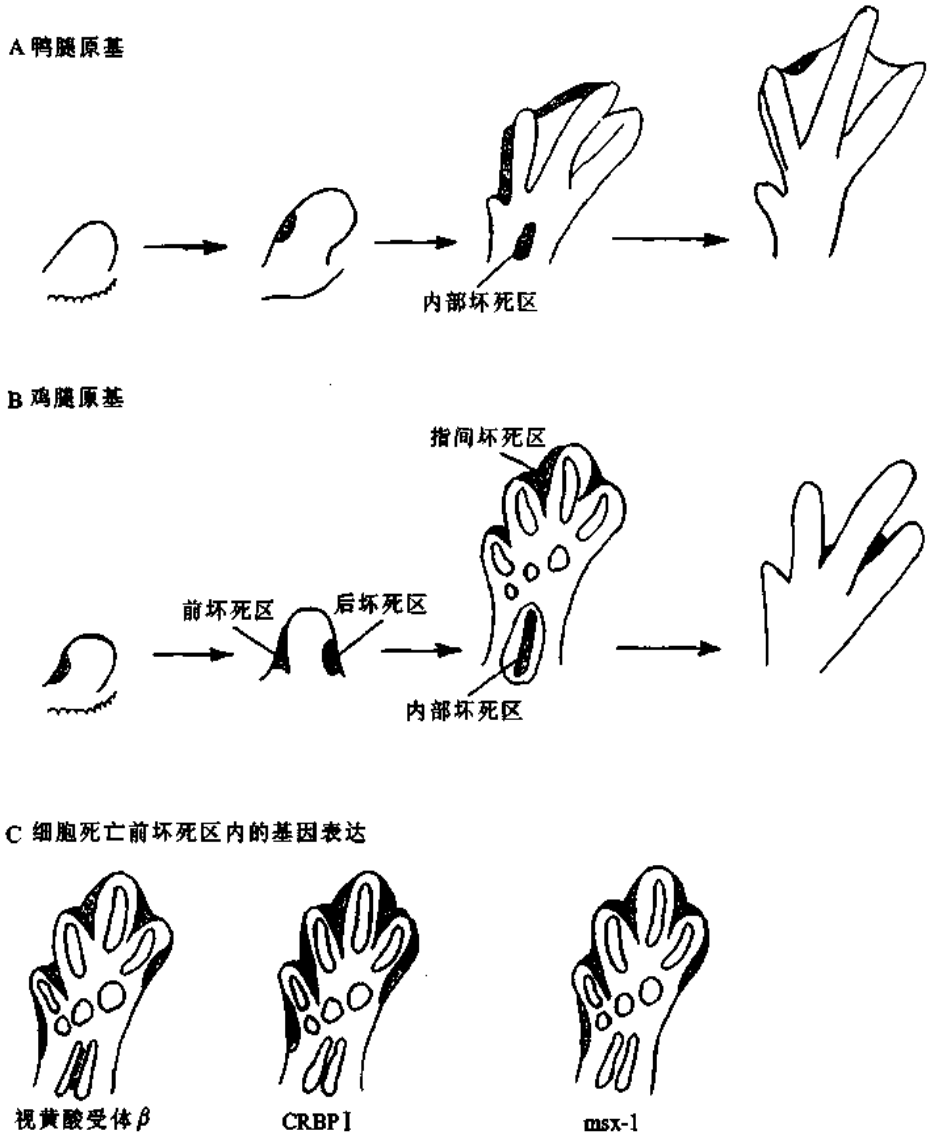


图 11.24 在鸭(A)和鸡(B、C)胚胎的腿原基中细胞死亡的模式

阴影表示死亡区。鸭中细胞死亡非常少(A),而在鸡腿趾间的组织中存在细胞广泛死亡的区域(B),某些基因的表达(C)预示在鸡后肢芽的一些区域细胞死亡

RNA 和蛋白质合成的水平急剧地降低。

除趾间坏死区(interdigital necrotic zone)之外，还有三个区域被细胞死亡所修饰，尺骨和桡骨由于中部坏死区(interior necrotic zone)而彼此分离，其他两个区域，前坏死区(anterior necrotic zone)和后坏死区(posterior necrotic zone)进一步定型附肢的末端(图 11.24B)。存在几个基因，它们的表达预示细胞注定死亡的那些区域。其中的一个基因是 *msx－1*，它处于附肢发育的末端，只在趾间坏死区表达(图 11.24C)。细胞视黄醇结合蛋白质 I(cellular retinal binding protein I，CRBPI)的基因也是这种表达模式。视黄酸受体也发现于 β 趾间坏死区和中部坏死区。用转基因动物或与这些信使的反义寡核苷酸培养的器官原基进行的研究使我们能确定它们是不是在附肢的这些区域负责细胞死亡。另外，这样的研究可能提供对进化的了解，如蝙蝠的前肢和海鸟的后肢能保持和扩展胚胎的蹼。

第二节　有尾两栖类附肢的再生

一些两栖类与爬行类、鸟类和哺乳类相比，它具有恢复被截断的附肢的能力。虽然无尾类仅在蝌蚪期能恢复一个附肢，而有尾类在蝌蚪期或成年期截断的附肢均能再生。有尾类附肢明显的再生能力使它成为一个极好的研究再生的模型。另外，调节再生附肢模式形成的基本原则，可能类似于在起始附肢发育期间所包含的那些原则。

再生的研究吸引了几代科学家的注意力，由此积累了有关此课题的大量极有价值的文献。有关再生的研究最早是由 Morgen(1901)进行的。由他所确定的再生的一些主要问题到现在仍在积极的研究中。其中包括这些再生细胞的起源和发育的潜能，在决定再生的附肢的结构中相邻组织的作用，和在不同动物中再生能力极大的不同的原因等。Morgen 认识到在重建失去部分中两个基本的形态发生过程：一是变形再生(morphallaxis)，它包括身体保留的部分重新组织以产生丧失的结构；另一个是新建再生(epimorphosis)，是由创伤表面产生新的组织，并逐渐恢复失去的部分。腔肠动物水螅类(*Hydra*)从切下的一片能重建整个身体的能力即属变形再生的例子。附肢再生是最彻底地研究过的新建再生的例子，但这个过程可能包括以上两种机制。在由创伤表面再生出新的组织前，截桩(stump)内的组织已发生了明显的重组。

一、附肢再生的过程

附肢再生最常用的研究对象是成体的蝾螈(*Triturus*)。其附肢再生的过程示如图 11.25，主要包括下列过程：

1. 创伤愈合(wound healing)

在附肢被截断以后，创伤的修复从伤口边缘表皮扩展并覆盖切口表面开始(图 11.26A，B)。这个过程进行很快，通常在一两天内完成。一旦伤口愈合，表皮细胞增殖，产生一个多层的细胞团，在截断附肢的顶端形成一个圆锥状的膨大。这个结构称为顶表皮帽(apical epidermal cap)。在截断附肢后不久，创伤处出现发炎反应。发炎反应消失后，表皮下面形成瘢痕组织。

2. 组织破坏和去分化

在残留附肢中出现大片的组织溶解。此时创伤表面下的区域释放胶原酶，使已存在组织的细

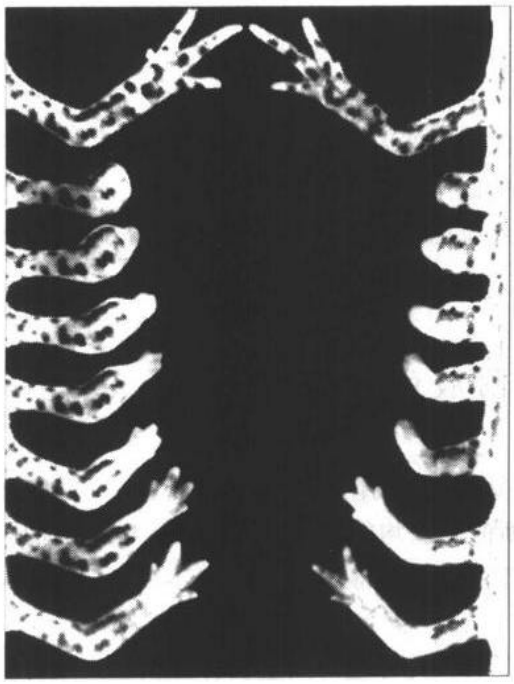


图 11.25 成体蝾螈前肢的再生
左侧示从前臂截断，右侧示从上臂截断。在这两种情况下，都能再生出具有合适的远端附肢成分的正常附肢

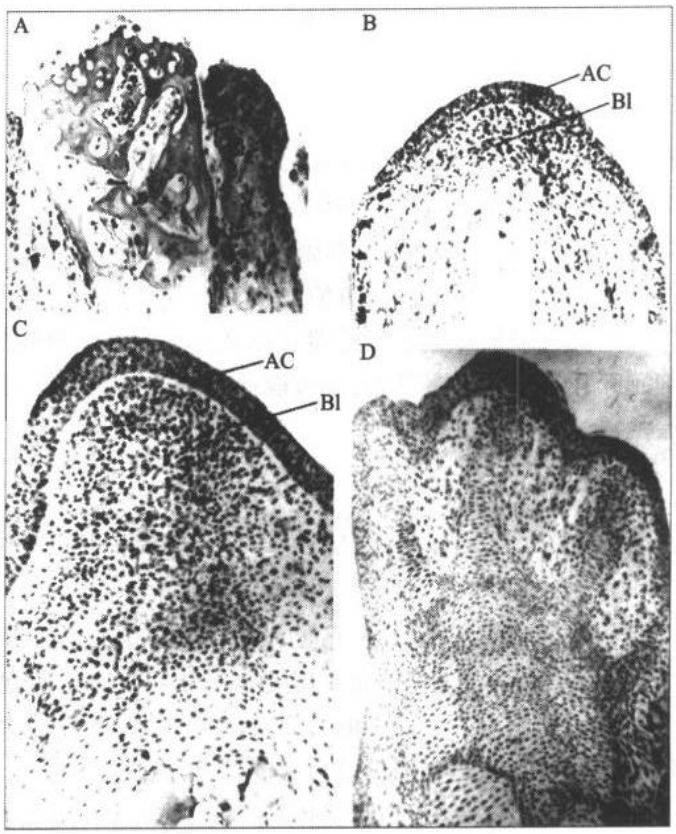


图 11.26 成体蝾螈附肢再生的分期
A. 直接在截肢后暴露的骨 B. 截肢后 16 天，外胚层已增厚成顶表皮帽(AC)；芽基细胞(Bl)正在其下面聚集 C. 21 天后，芽基已长的相当大，其内已有骨分化的迹象 D. 在 28 天的再生中骨原基已很好地发育

胞相继失去已分化的特征，彼此之间及与细胞外基质间分离，形成松散的间质。因此，以前的软骨、骨和结缔组织的细胞都呈现胚胎期间质细胞的形态，即使在电镜下观察也彼此一样，这个过程称为去分化(dedifferentiation)。在前一阶段形成的瘢痕组织也解离出细胞。

3. 再生芽基的形成

这些去分化的细胞在顶外胚层帽下形成一堆积突起，称为再生芽基(regeneration blastema)。随着芽基的形成，组织破坏的程度减弱。再生中的附肢也包含一个上皮－间质系统，它与许多胚胎器官的分化系统极其相似。此时芽基迅速分裂增生，并产生新的附肢结构。

4. 形态发生和分化

在芽基中第一个分化的组织是软骨。它首先出现于残存骨的尖端，并在其远端生长，逐渐附加使其完整恢复。此后恰如在正常胚胎附肢向外生长中那样，较远端的骨成分出现。当软骨完成其重建后，再生的软骨进行骨化。

肌肉形成包括软骨周围肌肉的重新出现和残存肌肉末端的增生。血管在重建的早期不明显，但此后它们从断肢残桩延伸到再生的芽基中，最后形成与原来血管分布相同的模式。许多神经在截肢时被切断，在截肢后很快神经纤维长入伤口处，并重建成原来的神经支配模式。神经在控制附肢再生中起重要的作用。

二、芽基细胞的来源和作用

再生芽基细胞来源于组织破坏期间断肢残桩组织局部去分化。芽基细胞的另一个来源可能是在截肢的影响下，从身体其他部位来的贮备细胞(reserve cell)。芽基细胞的起源已用 X 射线得到证实。X 射线的照射防止再生，这可能是由于在照射过的组织中细胞有丝分裂受到损害。如果附肢的一个狭窄的部分被照射，并经被照射区截肢，则附肢不能再生(图 11.27B)。然而，如果同一附肢在未照射的部位截肢，则可再生出正常的附肢(图 11.27A,C)。显然，再生所需的细胞必须由接近截肢位点的区域供给和增生。

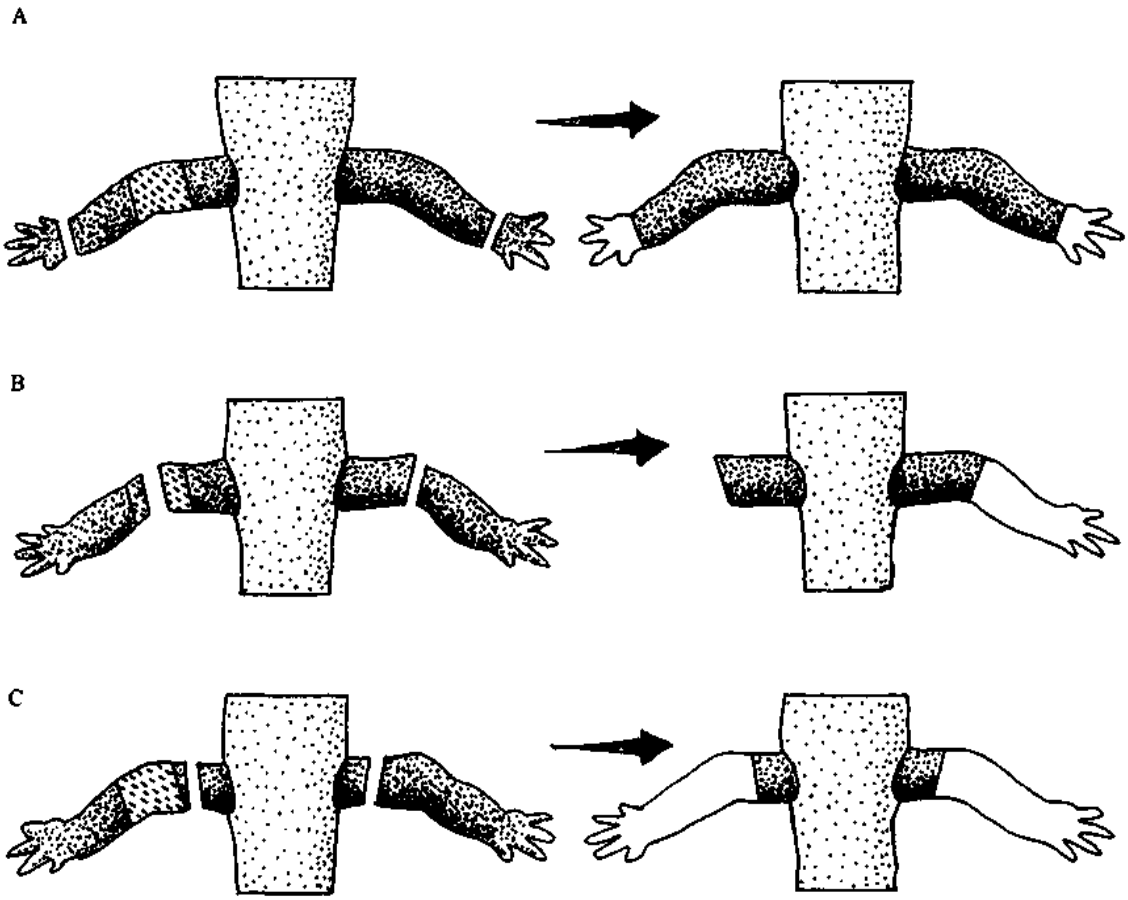


图 11.27　形成芽基的细胞来自截肢位点附近的一个狭窄区域(仿 Saunders,1982)

这是通过用 X 射线照射蝾螈肘部的一个狭窄区域确定的，被照射区域中的细胞再不能增殖。此后如果在照射位点的远端(A)或近端(C)截肢，则可再生出一个正常的附肢。如果在经过照射的位置进行截肢(B)，则附肢不能再生。这表明芽基的有丝分裂的细胞来自截肢位点附近的一个局部的区域

已知局部的细胞支持再生，其中哪些细胞将分化为不同的附肢组织？理论上的可能来源如表 11.1。这些已分化的细胞会失去它们特有的性质，增殖和随后只根据它以前的分化状态重新分化吗？已分化的细胞真的能去分化为能形成各种不同细胞的多潜能干细胞吗？真的存在保持了胚胎时多潜能性质，能形成附肢的各种不同分化细胞的贮备细胞吗？这些很难通过实验来检测，因为附

肢组织不是纯粹的单一细胞类型的集合。除已特化的细胞外，大多数组织都含有结缔组织细胞，而一些结缔组织细胞是多潜能的。

表 11.1 附肢再生细胞来源的理论可能性

肌肉组织	去分化	芽基再生细胞	重新分化	肌细胞
结缔组织细胞 肌细胞	去分化	芽基再生细胞	分 化	软骨细胞 骨细胞 肌细胞
局 部 贮备细胞		芽基再生细胞	分 化	结缔组织细胞 软骨细胞 骨细胞 肌细胞

检测组织分化潜能的常规实验步骤是：用 X 射线照射一个二倍体的受体动物，以限制受体细胞参与再生的能力，然后植入取自三倍体供主的组织。此后将受体的附肢截断，以使其再生并对其进行组织学的分析。三倍体的细胞核在一种组织中的存在表明，它是由供主的组织来的，而且参与了这个新组织的再生。在某些实验中，供主三倍体的细胞还用^{3}H－胸腺嘧啶标记，在再生组织中供主细胞可通过三倍体的，具有放射活性的细胞核进行检测。当供主组织清除肌肉和结缔组织的软骨时，供主类型的细胞发现于再生的软骨、软骨膜、关节的结缔组织和成纤维细胞中。然而，在肌肉和表皮中未发现有供主细胞。另外，当供主组织是肌肉时，供主细胞发现于所有的中胚层衍生物中。因此，在肌组织中细胞的分化潜能显得比在软骨组织中细胞的大。但是，由于肌肉周围一些成纤维细胞的存在，而不能精确地排除作为某些组织的来源。

表皮不能产生中胚层的组织，尽管皮肤的真皮能产生几种中胚层的组织。在美西螈（*Ambystoma mexicanum*）中用三倍体/二倍体细胞标记的移植实验证明，43％的芽基细胞实际上来自真皮的成纤维细胞，所以，真皮产生与在截肢面上可得到的不同类型细胞不相称数量的芽基细胞。真皮和肌肉二者都含有大量的成纤维细胞。因此，必须考虑到这种可能性，许多再生的中胚层衍生物是由成纤维细胞产生的。

三、再生作用的调节

调节再生附肢形成的因素可能有三个：表皮，激素和残留附肢中的神经。

1. 表皮的作用

在截肢后不久，皮肤表皮迅速覆盖创面，并增生形成多层细胞的顶表皮帽。将顶表皮帽移植到再生芽基的基部，可诱导超额附肢的再生。因此，顶表皮帽可能对附肢得以再生是必须的。其他的表皮移植物没有这样的作用，这表明在这个过程中顶表皮帽的特化。为了证实表皮在促进再生中的必要性，将断肢切除并插入体腔中，伤口的表皮不能形成，也就不会再生。然而，如果截断附肢并在将它插入体腔之前表皮的伤口就已愈合，则附肢可以再生。现已利用这种实验的优越性，比较了在再生的（表皮完整）和非再生的（缺少表皮）断肢残桩中，^{3}H－胸腺嘧啶的掺入和有丝分裂的水平。研究证实，当表皮存在时 DNA 的合成和有丝分裂的水平都高得多。这些结果提示，伤口的表皮刺激在其下方组织中的细胞分裂，因而促进芽基的形成和随后附肢的再生。

再生附肢的顶表皮帽和鸡胚附肢芽的顶外胚层嵴间的相似性是明显的，二者都能起类似的作用，通过刺激细胞的增殖，提供细胞就近分化，以产生定形的附肢组织、从而促进附肢向外生长。

2．激素的作用

附肢再生也受内分泌系统的影响。将垂体切除，可阻止有尾类附肢的再生，如在截肢时切除垂体，阻止效应最明显。如果延迟垂体切除的时间，则再生的程度依赖于延迟时间的长短。如果延迟13天切除垂体，对再生就不发生什么效应。这些结果提示，垂体激素的作用只在再生开始的阶段有效。参与的激素可能是生长素和催乳素。甲状腺素可能也参与附肢再生的调节。

3．神经的作用

神经对附肢再生的作用十分明显。在截肢后，神经很快就长入再生芽基，并重建正常的神经模式。然而，如果截肢残桩没有神经支配，再生就受到干扰。另外，如果神经纤维再生长入截肢位点，组织将退化。换言之，如果轴突得以重新长入残桩，再生可能重新开始，特别是当截肢的伤口再次受到扰乱时。这些结果提示，神经促进再生。这种解释得到以下实验的支持，当一个附肢的神经被偏转到附肢基部的一个皮肤的伤口处时，它将促进一个超数目附肢的形成。神经的影响被认为是由神经组织释放的营养因子(trophic factor)的作用。神经营养的影响是由所有的神经(运动神经、感觉神经、或中枢神经)产生的，不管它们是否与中枢神经系统具有功能的联系。在再生中需要一个临界数目神经纤维的存在。低于此临界值则再生不能发生。高于此临界值，再生能发生，但不受神经组织数量进一步增加的影响。神经被认为是通过促进RNA的合成，和促进形成芽基的中胚层细胞的有丝分裂，实现对附肢再生的影响。一种神经营养因子是神经胶质生长因子(glial growth factor)，它是由神经细胞产生的，存在于芽基中，它能刺激去神经支配芽基的有丝分裂活动。另外，生长因子在发育过程中具有关键的作用。神经营养的影响是暂时的，正如在芽基开始去分化的时期去神经支配后，有尾类的附肢持续的分化和形态发生所证实的。然而，去神经支配的再生附肢的生长迟缓。很明显，神经对起始再生是必须的，但再生附肢的重新分化和形态发生不依赖于神经。

脊椎动物中那些附肢不能再生的种类，截肢伤口单位面积含有比蝾螈(*Triturus*)较少的神经纤维。有可能那些不能再生附肢的种类至少部分地是由于神经供应的不足，因为如果对截肢创伤处补充神经供应，则可在蜥蜴、蛙和袋鼠中诱导附肢的再生。

四、细胞分化模式的恢复

附肢再生的一个最具吸引力的方面是，它产生的细胞分化模式是在胚胎的附肢发育期间建立的。如当附肢被截断后，剩余的残桩仅含肱骨，但再生的结构将包括正常的桡骨、尺骨、腕骨和指骨。再生的组织既不多，也不少，而且各种附肢成分按正确的顺序排列。另外，附肢总是在远端的方向再生，不管截肢残桩的极性(图11.28)。这一现象被称为远端转变的规律(rule of distal transformation)。附肢再生的第二个有趣的现象是表现出附肢再生的特性。一个再生的附肢除了在截肢的断面恢复丧失的附肢成分外，也能以特定的模式恢复这些部分。如果将一个从截断的前肢形成的芽基移植到只含一个肱骨的残桩上，产生的附肢含有所有失去的中间部分(图11.29)。这是一个明显调节再生的例子，称为插入的再生(intercalary regeneration)。

French等(1976)已经提出一种极性坐标模型(polar coordinate model)来解释在两栖类附肢再生期间及其他再生系统中，模式是怎样被重新建立的。此模型认为附肢细胞具有它们的位置信

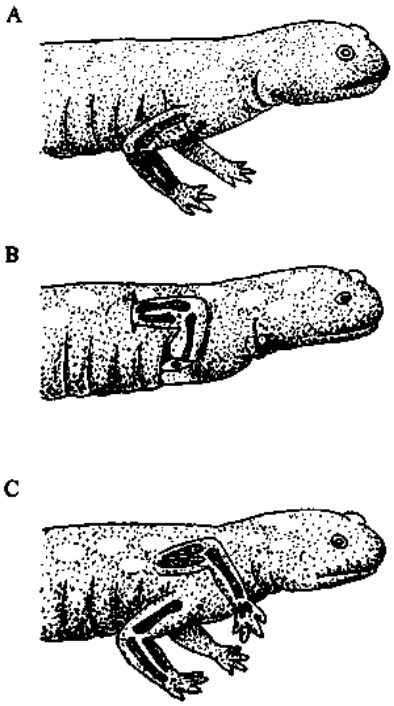


图 11.28　有尾两栖类的附肢只能在远端方向再生，即使截肢残桩的近－远轴被颠倒

在这种情况下，一个蝾螈(*Ambystoma*)的附肢顶端被切除，剩余附肢旋转后插入躯干部的皮肤中。当附肢在此处愈合后，它被保留在肩部，产生两个伤口(B)。一个正常的附肢从右肩残桩再生出来。而具有颠倒极性的附肢再生出一部分肱骨，前臂和手，因此只添加了远端的成分(C)

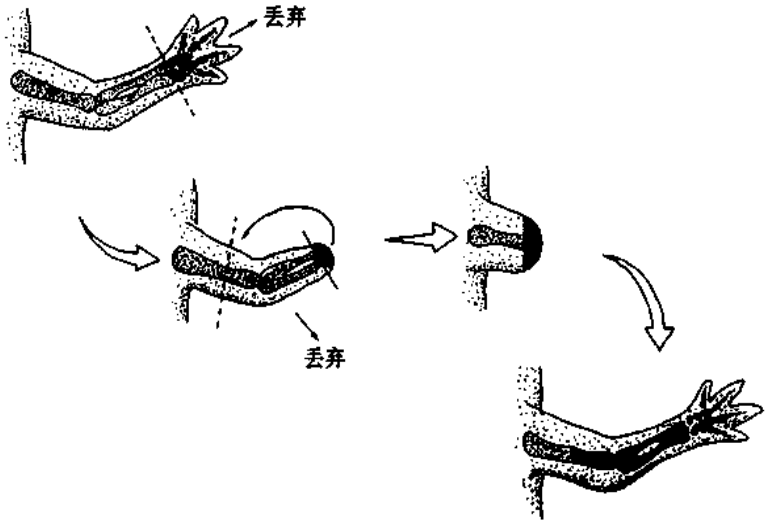


图 11.29　如果将一附肢的中间成分除去，失去的部分将被插入再生恢复

首先将一个有尾类附肢的顶端切下，产生一个再生芽基。此芽基被移植到刚刚从上臂截断的附肢上，这样产生一个近侧与远侧部分愈合的附肢。失去的部分被插入再生恢复

息。此位置信息假设是沿极性坐标特化的。在这样的系统中，一个细胞的位置是由两个值(value)

决定的：一个圆周的和一个放射的成分(图 11.30Ⅰ)。圆周的值(1～12)是按时钟表面一样的圆圈排列。这些数值将特指在 A－P 和 D－V 轴上的位置。放射的值(A～E)代表沿 P－D 轴的位置，最外侧的圆圈(A)代表最近的区域，而最内侧的圆圈(E)代表最远的部分。

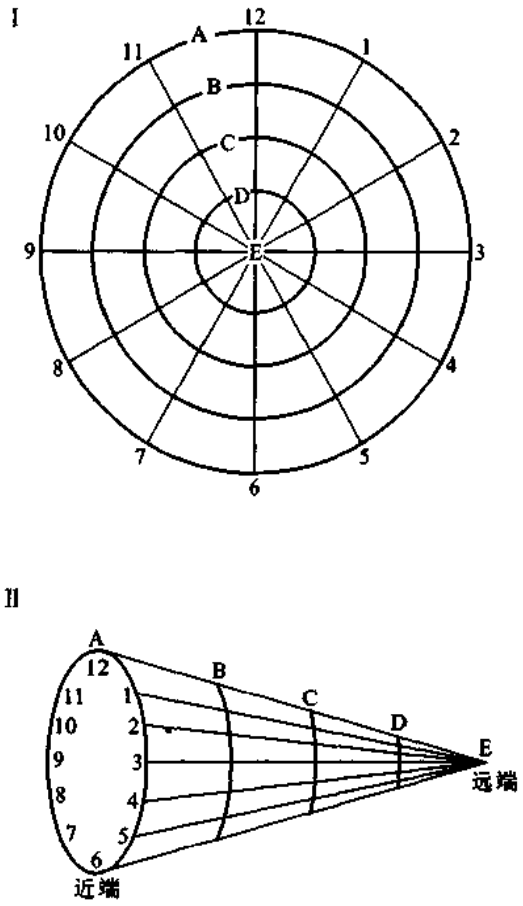


图 11.30

Ⅰ．极性坐标模型认为细胞将具有圆周的值(1～12)和放射的值(A～E)，前者特化为前－后轴和背－腹轴，后者代表近－远轴　　Ⅱ．它可示于一时钟表面上，其放射值能被扩展成圆锥形，以便更清楚地描绘近－远轴

注意，这个二维的同心圆的图形能向外扩展形成一个圆锥形，它可以更直观地描述一个附肢(图 11.30Ⅱ)。这个圆锥的顶端代表指，而其底部代表肩部。现在有人相信，真皮细胞具有这种位置信息，而且负责正确模式的再生。

已假设有几种规则管理再生的过程。

(1) 插入规则(intercalation rule)

如果一些具有不同圆周的或放射的位置值的细胞，通过移植或伤口愈合被带到一起，然后开始细胞分裂，而这种细胞生长对再生失去的位置值是必须的，此为插入过程。如前面提到的，附肢的中间值(桡骨和尺骨)被除去，它们将再生以补充失去的附肢部分。

另外，如果圆周的位置值丧失，插入将通过两个较短的，而不是较长的两条路线发生。即如果位置值 12 和 3 彼此相对，则将形成 1 和 2，而不是形成 10、9、8、7、6、5 和 4(图 11.31)。这是最

短的插入规则(shortest intercalation)。

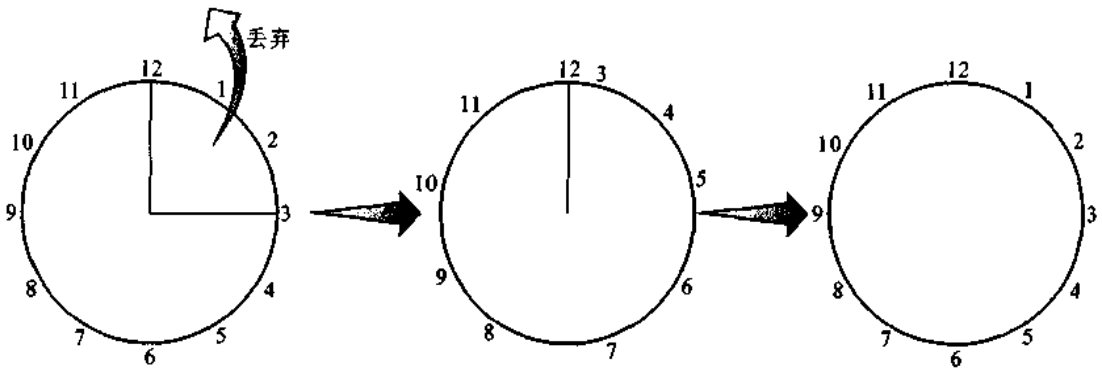


图 11.31 如果除去一个组织，以致不相邻的位置值被带到一起，细胞将被刺激进行分裂和插入失去的位置值

此模型进一步表明这些位置值将根据最短的路线再生。在此处 1 和 2 将再生以形成正常的附肢，而不是复制位置值 4 到 11

(2) 远端化规则

一个截断附肢的再生总是产生切断处远端的部分。这一结果意味细胞的生长仅仅再生较远端的位置值。极性坐标模型也预示这是怎样发生的(图11.32)。在截肢以后，伤口将被从边缘来的

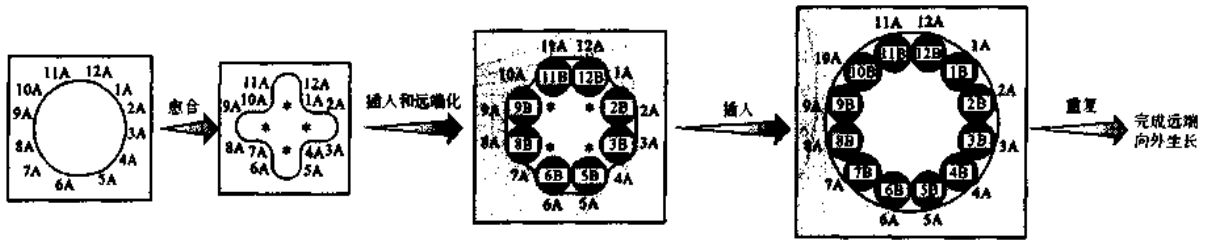


图 11.32 从一创伤表面远端向外生长的模型

截肢除去模式的 B、C、D 和 E 水平，留下 A(阴影部分)。伤口的边缘以圆圈代表。在伤口愈合期间，不同的圆周值被绘制成相互联结的，产生圆周值的插入(由星形号表示)。新细胞具有的位置值与以前存在相邻的细胞相等，但强迫这些新细胞到下一个较远的水平(B)。B 水平被随后的插入所完善，此过程被重复直到最远端的位置值(E)再生

表皮愈合，伤口表面被从边缘向中央迁移的真皮的成纤维细胞封闭。这将引起那些具有不同圆周位置值的真皮成纤维细胞彼此相对。插入发生，产生复制以前存在的细胞的圆周位置值的新细胞。此模型认为，在 P－D 轴的水平上相同的圆周位置值不能被复制。所以新细胞被强迫接收一个较远的位置值。这被称为远端化规则(distalization rule)。因此，如图 11.32 中所示，在 A－水平的截肢，再生的新细胞具有 B－水平的位置值。远端化的过程一直持续到最远端的位置值被再生为止。

支持远端化规则的证据发现于各种通过实验诱导再生的附肢中。如果将蝼蛄(*Notophthalmus viridescens*)的附肢芽基切除，经旋转后再连接到自己的断肢残桩上或是对侧位置的附肢残桩上，有超数量的附肢再生(图11.33)。这些明显的超数量的附肢显然是在两个轴之间最大的中断点形成的。图 11.34 解释了一个断肢残桩和一个经旋转的芽基位置值间的关系，由此 D－V 轴是不匹配

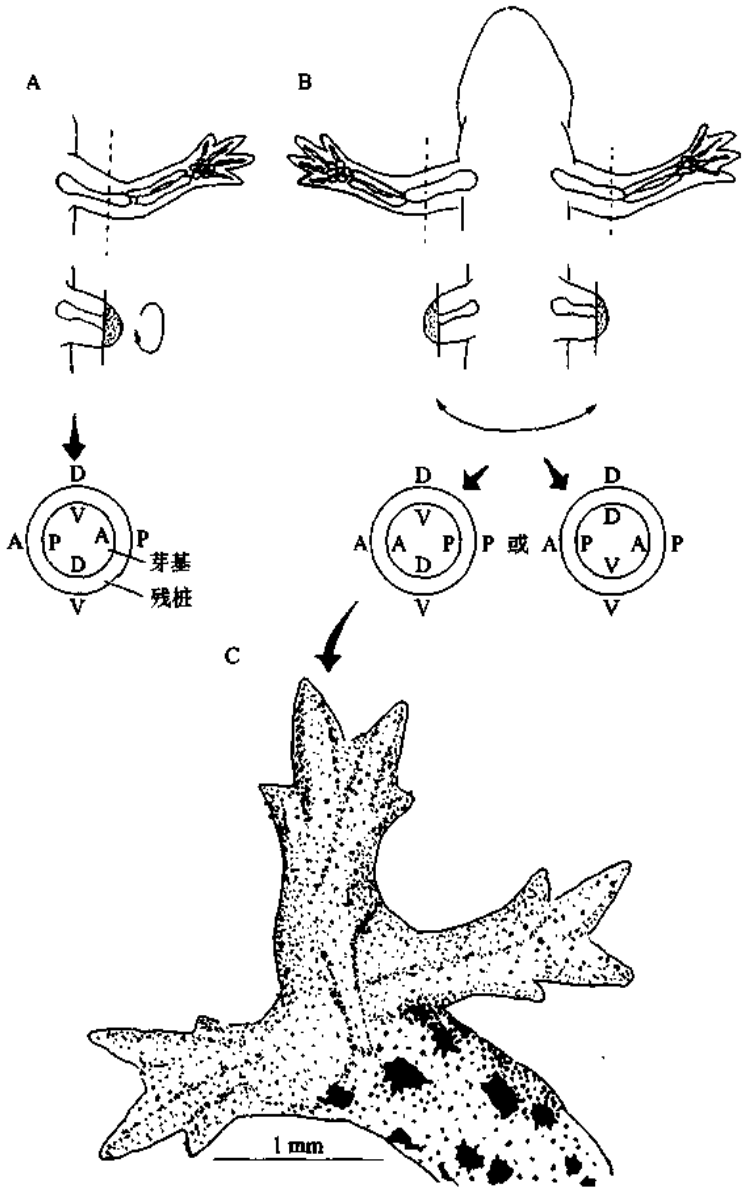


图 11.33　将再生芽基切除，并置于一附肢残桩上，使它们的轴不匹配

A. 两个轴都不匹配　B. 只有或是前－后轴，或是背－腹轴是不匹配的　C. 这些圆圈位置值的不匹配常常产生超数目的附肢

的，而 A－P 轴是匹配的。由于插入的规则，在 D－V 位置值相对的地点应当复制一个完全的圆周值。因为插入能产生不匹配位置值的完全的圆圈，因此我们期望在每个这样的位点产生最远的生长。图 11.33C 所示的一种再生完全符合这个预言。

远端向外生长的数目应对应于在一个向外生长的基部位置值的总数。在一个完全的圆周位置值达到截肢面的情况下，许多不相邻的位置值在伤口愈合期间产生接触，因此得到最大的远端向外生长。不管怎样，可以在有较少位置不一致时建造附肢。如双前肢或双后肢能建成，并于此后截肢(图 11.35A)。在截肢面的位置值可能如图 11.36 所示。在这种情况下，可能存在比一个完全的

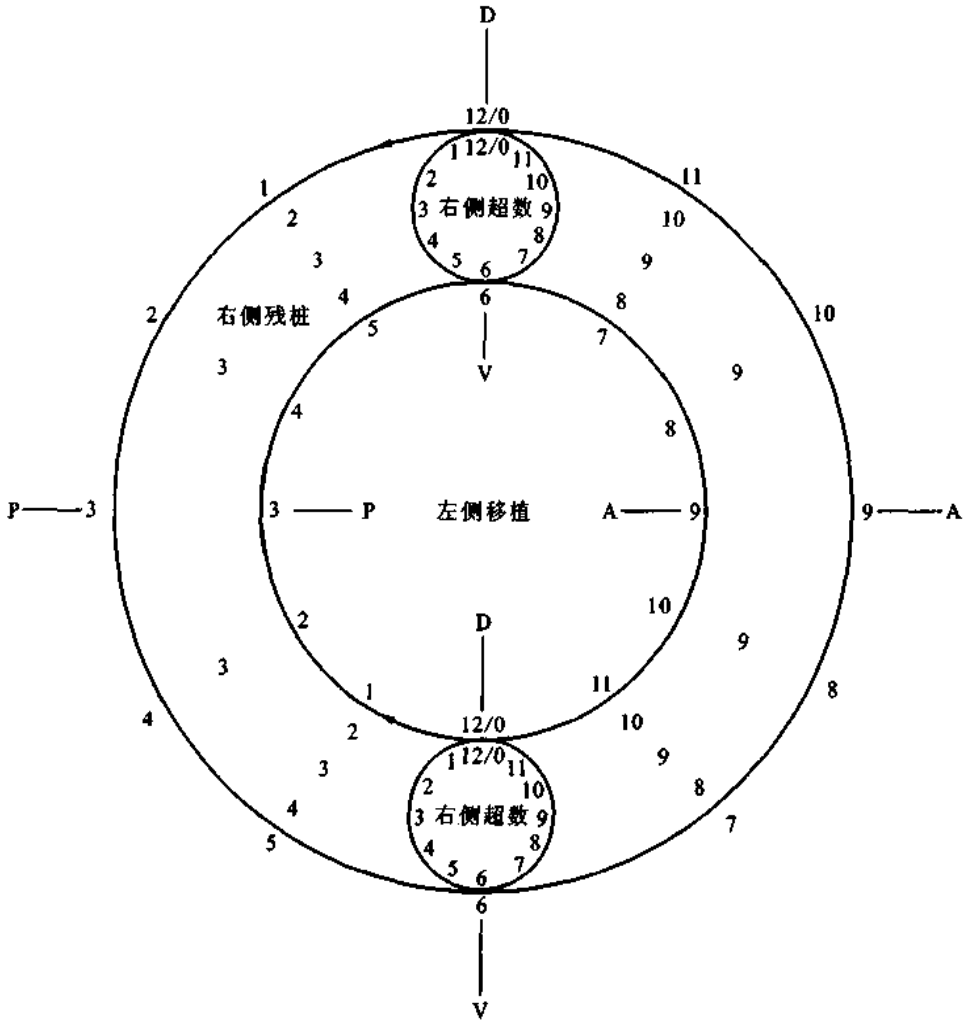


图 11.34 极性坐标模型

此模型可预示由不匹配的前－后轴或背－腹轴产生超数目附肢的数目和位置。此图所示为一个左腿的芽基被旋转后移植到右腿的残桩上，所以其背—腹轴处于最大的不对称处。其圆周值沿每个圆圈排列。圆圈间的数目是由在受体和移植物相对的位置值间最短的插入路线产生的位置值。注意，在轴不匹配的位点，最短的插入路线可取两个方向之一，因此产生一个圆圈的位置值。这些圆圈相等于一个断肢的伤口表面，因此，除了从芽基向外生长外，在这两点产生远端的向外生长

圆周位置值较少的不匹配现象，所以只需要较少几圈插入以修正位置值的不一致。因此可预期附肢会很快逐渐变细，具有较少的，但是对称的远端成分(图 11.35B)。

由于有尾两栖类具有如此明显的再生能力，因而提出争议，认为它们代表一种测验模式形成模型的例外的情况。最近，在有尾类和无尾类之间进行镶嵌的移植实验得到的结果表明，类似的模式形成机制在这两种不同的动物中起作用。如果无尾类爪蛙的附肢芽被移植到有尾类美西螈的断肢残桩上，以致它们的圆周位置值相匹配，超数目的指不能形成。然而，如果将移植物旋转，使 A－P 轴不匹配，超数目的指就形成。这些结果提示，在四足动物附肢中存在一种模式机制基本上是相同的。

最后，在四足动物附肢中调节再生的这些机制可能与在发育期间调节模式的机制是相同的。

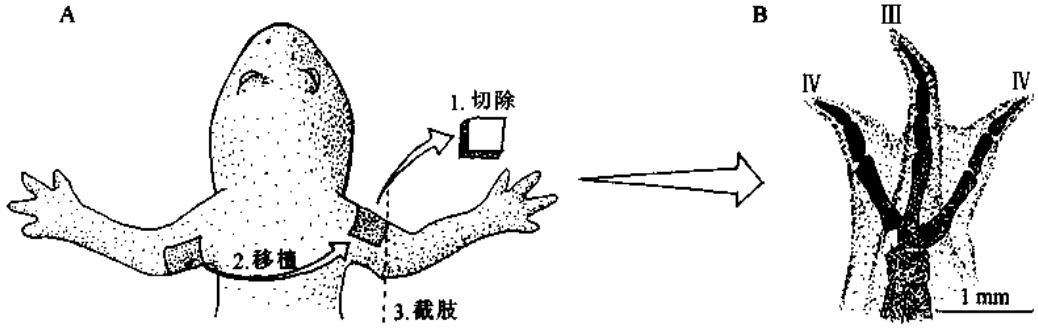


图 11.35　移植后半部附肢到对侧前半部附肢上产生对称的附肢(A)。在这种移植中，当从前肢截断时产生一个对称的、逐渐变细的、有时是截短的附肢(B)

Ⅲ. 3 指，Ⅳ. 4 指

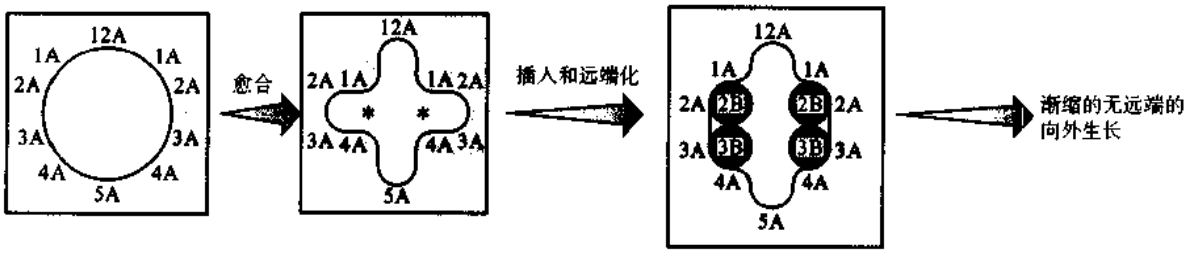


图 11.36　双前肢或双后肢的长出可用极性坐标模型说明

在这种情况下，只有较少的位置值在伤口愈合时期聚集到一起，所以仅有较小的插入。结果是远端的向外生长仅限于较少的放射值，此附肢是截短的。注意：附肢将也是对称的

再生不仅模仿胚胎附肢的发育，而且再生的和发育的附肢组织能相互作用形成一个正常的附肢。当移植一个蝾螈幼体的附肢芽到再生的芽基残桩上，所以它们的轴是合适地匹配的，产生一个正常的附肢(图 11.37A)。然而，如果它们的轴是不匹配的，正如在再生的芽基和残桩实验中观察到的，形成超数目的指(图 11.37B)。因此希望，对再生的和发育的系统研究可能阐明在这两种情况下模式形成的控制。另外，这些基本原则对其他发育系统中模式形成是公用的。

在前面我们提到视黄酸在附肢芽发育期间好像起一种特化 A－P 轴的作用。视黄酸在有尾类蝾螈附肢的再生期间，对附肢的模式形成具有相同的显著影响。实验发现，如果将成体蝾螈的附肢截断，然后将蝾螈浸泡于视黄酸溶液中，再生的附肢具有在 P－D 轴上复制的成分。

不管附肢是在那种水平上截肢的，一个完全的附肢能从残桩上长出。如果一个附肢经腕部截断，一个包括肱骨、桡骨、尺骨、腕骨和指骨的完全的附肢将从截肢断面的远端向外生长。视黄酸明显地重新设定芽基中细胞的位置信息到较近的值，所以那些应形成远端结构的细胞，现在被重新设定形成一个较近的结构，肱骨。还发现近端重新设定的范围依赖于视黄酸的浓度，或处理时间的长度(图 11.38)。在较低浓度时，近端化的程度减小，所以当一个附肢从腕部截断，并浸泡于低浓度的视黄酸中时，在断肢残桩上发育出桡骨和尺骨，而不是肱骨。

虽然在成体的蝾螈中视黄酸主要影响 P－D 轴，但在发育的蛙和蟾蜍中，在发育期间 A－P 和 P－D 轴也受其影响而改变。如果蝌蚪的腿浸于高浓度的视黄酸中后，从截断的位置再生出两个完全的附肢(P－D 轴复制)，它们是镜面对称的。

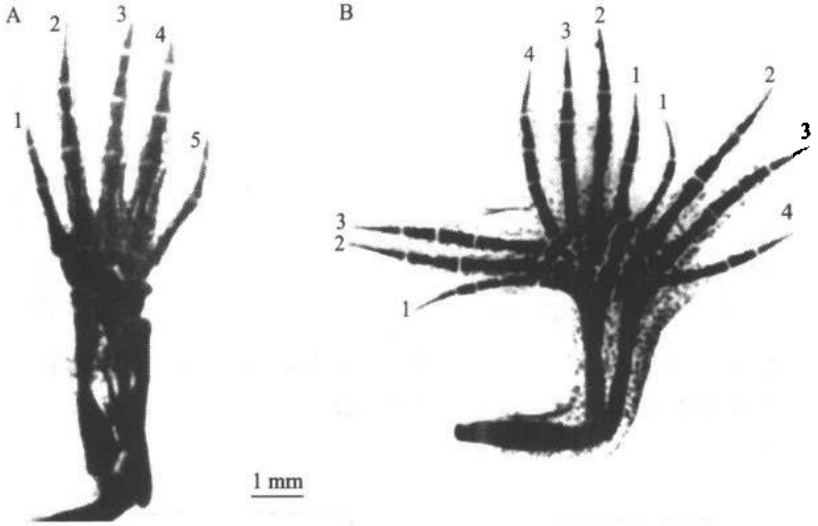


图 11.37 再生和发育的附肢可能遵循相同的位置线索

A. 移植一个附肢芽到一个再生附肢的残桩上产生一个正常的附肢 B. 如果此附肢芽被旋转，再接连到一个再生的附肢残桩上，以致其前－后轴被颠倒时，形成超数目的指骨，正如只用再生的芽基和残桩做同样的实验时一样，形成超数目的指骨

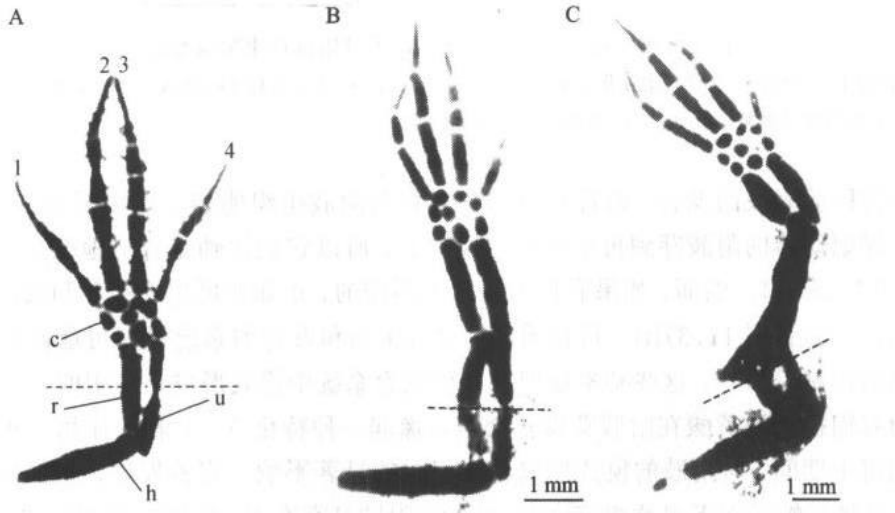


图 11.38 通过桡骨和尺骨截肢及经增加浓度的视黄醇棕榈盐，视黄酸的衍生物处理的蝾螈附肢的再生

虚线标记截肢的平面

A. 对照，示被取掉的桡骨(r)，尺骨(u)，8 块腕骨(c)和 4 块指骨。h. 肱骨 B. 中等剂量，产生被取掉的桡骨和尺骨，随后复制桡骨和尺骨，然后是腕骨和指骨 C. 高剂量，一个完全的，由肱骨开始的附肢从截肢的平面形成

还不清楚在细胞水平视黄酸是什么作用。视黄酸似乎不像是决定正常模式的因素，因为至少在两栖类中这种分子的梯度尚未检测到。然而在了解模式形成中它的重要性是清楚的。因为它在鸡、蝾螈和蛙中产生相同的反应。视黄酸的研究已经证明，模式形成的机制可能跨越种的界限是

相似的。另外，视黄酸是唯一知道能重新设定模式的外部因素。如果能确定视黄酸在细胞水平是什么作用，我们将掌握重要的线索以便了解是什么正常地调节在发育和再生中附肢的模式。

参考文献

1 Balinsky B I. Supernumberary limb induction in the Anura. J. Exp. Zool., 1974

2 Bryant S V, Gardiner D M. Retinoic acid, local cell - cell interactions, and pattern formation in vertebrate limbs. Dev. Biol., 1992, 152: 1 ~ 25

3 Coelho C N D, Upholt W B, Kosher R A. The expression pattern of the chicken homeobox - containing gene *GHox - 7* in developing polydactylous limb buds suggests its involvement in apical ectodermal ridge - directed outgrowth of limb mesoderm and in programmed cell death. Dev. Biol., 1993, 52: 129 ~ 137

4 Geduspan J S, MacCabe J A. The ectodermal control of mesodermal patterns of differentiation in the developing chick wing. Dev. Biol., 1987, 124: 398 ~ 408

5 Iten L E, Bryant S V. The interaction between blastema and stump in the establishment of the anterior - posterior and proximal - distal organization of the limb regenerate. Dev. Biol., 1975, 44: 119 ~ 147

6 Leonard C M, Fuld H M, Frenz D. A, *et al*. Role of transforming growth factor - β in chondrogenic pattern formation in the embryonic mouse limb: Stimulation of mesenchymal condensation and febronectin gene expression by exogenous TGF - β and evidence for endogenous TGF - β - like activity. Dev. Biol., 1991, 145: 99 ~ 109

7 Maden M. Retinoids and the control of pattern in limb development and regeneration. Trends Genet., 1985, 1: 103 ~ 107

8 Maden M. The homeotic transformation of tails into limbs in Rana temporaria by retinoids. Dev. Biol., 1993, 159: 379 ~ 391

9 Morgan B M, Izpisúa - Belmonte J C, Duboule D, *et al*. Targeted misexpression of Hox - 4.6 in the avian limb bud causes apparent homeotic transformation. Nature, 1992, 358: 236 ~ 239

10 Niswander L, Martin G M. FGF - 4 and BMP - 2 have opposite effects on limb growth. Nature, 1993, 361: 68 ~ 71

11 Riddle R D, Johnson R L, Laufer E *et al*. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. Cell, 1993, 75: 1401 ~ 1416

12 Robert B, Lyons G, Simandl B K, *et al*. The apical ectodermal ridge regulates Hox - 7 and Hox - 8 gene expression in developing chick limb buds. Genes Dev., 1991, 5: 2363 ~ 2374

13 Rowe D A, Fallon J F. The proximodistal determination of skeletal parts in the developing chick leg. J. Embryol. Exp. Morphol., 1982, 68: 1 ~ 7

14 Saunders J W Jr. The proximal - distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. J. Exp. Zool., 1948, 108: 363 ~ 405

15 Saunders J W Jr, Reuss C. Inductive and axial properties of prospective wing - bud mesoderm in the chick embryo. Dev. Biol., 1974, 38: 41 ~ 50

16 Singer M. On the nature of the neurotrophic phenomenon in the urodele limb regeneration. Am. Zool., 1978, 18: 829 ~ 841

17 Solursh M. Ectoderm as a determinant of early tissue pattern in the limb bud. Cell Diff., 1984, 15: 17 ~ 24

18 Solursh M, Drake C, Meier S. The migration of myogenic cells from the somites at the wing level in avian embryos. Dev. Biol., 1987, 121: 389 ~ 396

19 Summerbell D. The effect of local application of retinoic acid to the anterior margin of the developing chick limb. J. Embryol. Exp. Morphol., 1983, 78:269～289

20 Tabin C J. Retinoids, homeoboxes and growth factors: Toward molecular models for limb development. Cell, 1991, 66:199～217

21 Thaller C, Holfmann C, Eichele G. 9－cis retinoic acid, a potent inducer of digit formation in the chick wing bud. Development, 1993, 118:957～965

22 Zanetti N, Solursh M. Control of chondrogenic differentiation by the cytoskeleton. J. Cell Biol., 1984, 99:115～123

第十二章　眼的发育

脊椎动物的眼根据其功能是一个非常特殊的器官。外部世界的图像被集中于视网膜，它将这一信息转译并传送到脑，在脑中进行加工处理，使机体感受外部美丽的世界。视网膜接受图像是由一系列发育的透镜成象完成的。眼是由几个胚层来源不同的部分，经过一系列的诱导作用和时间、空间上的协调，形成的一个具有精确功能的器官。它包括著名的"诱导链"的概念，是研究和分析发育中组织间相互作用和细胞分化所采用的一个经典的实验动物模型。另外，视神经从眼投射到脑(顶盖)，视网膜－顶盖系统已成为研究中枢神经系统发育及再生的常用实验动物模型，其控制机制可以用于其他的发育系统。

第一节　眼的早期形态发生概述

眼的发育开始于原肠胚形成时，卷入原肠腔内的内胚层和脊索中胚层向前移到头部，因此在预定晶状体外胚层的下面是咽部原肠的内胚层。这种关系一直持续到神经胚早期。此时侧中胚层(预定心脏中胚层)的边缘恰好位于预定晶状体外胚层的后方。来自这两种组织的诱导刺激，与相连的预定晶状体外胚层相互作用，使头部外胚层产生一种形成晶状体的倾向。这种潜在的晶状体形成能力的激活和头部外胚层中形成晶状体的精确定位是由视泡(optic vesicle)完成的。在人类，视泡是从22天胚胎间脑侧壁的两个突出部分开始的(图12.1)。这两个突起继续从间脑向外侧覆盖的外胚层生长，并以视柄(optic stalk)与间脑保持连接。

当视泡与表面头部外胚层的预定晶状体相接触时，它们相互作用，外胚层增厚形成晶状体板(lens placode)，视泡外壁内陷形成双层壁的视杯(optic cup)(图12.1)。视杯外层的细胞产生色素，发育为色素视网膜(pigmented retina)。内层的细胞迅速增殖并分化为各种各样的光感受器、胶质细胞、中间神经元和神经节细胞，它们共同构成神经视网膜(neural retina)。神经视网膜也产生细胞外基质成分，称为玻璃体(vitreous body)。神经视网膜中神经节细胞的轴突(axon)，在视网膜中央的视乳突(optic disk)处相遇集中，经由视柄通向间脑。此时视柄称为视神经(optic nerve)。晶状体板形成后接着内陷形成晶状体窝(lens pit)，继而脱离表皮形成晶状体泡(lens vesicle)。最后分化为外侧的晶状体上皮和内侧的晶状体纤维。在晶状体泡与表皮脱离之后，视网膜和晶状体泡与覆盖的表皮接触，诱导表皮形成透明的角膜(cornea)。视杯的边缘部分的色素上皮向晶状体扩散形成虹膜(iris)和睫状体(ciliary body)的上皮。以后神经嵴起源的头部间质形成这两部分的基质(stroma)。围绕在色素视网膜外面，神经嵴起源的头部间质聚集形成充满血管的脉络膜(choriod)和结缔组织的巩膜(sclera)，它们共同起营养和保护眼球的作用(图12.2)。

眼的肌肉有几种来源，虹膜和睫状体的内部肌肉(intrinsic muscles)分别控制瞳孔(pupil)的大小和晶状体的形状，分别来自视网膜色素上皮和神经嵴。控制眼球在眼眶中活动的外眼肌(extrin-

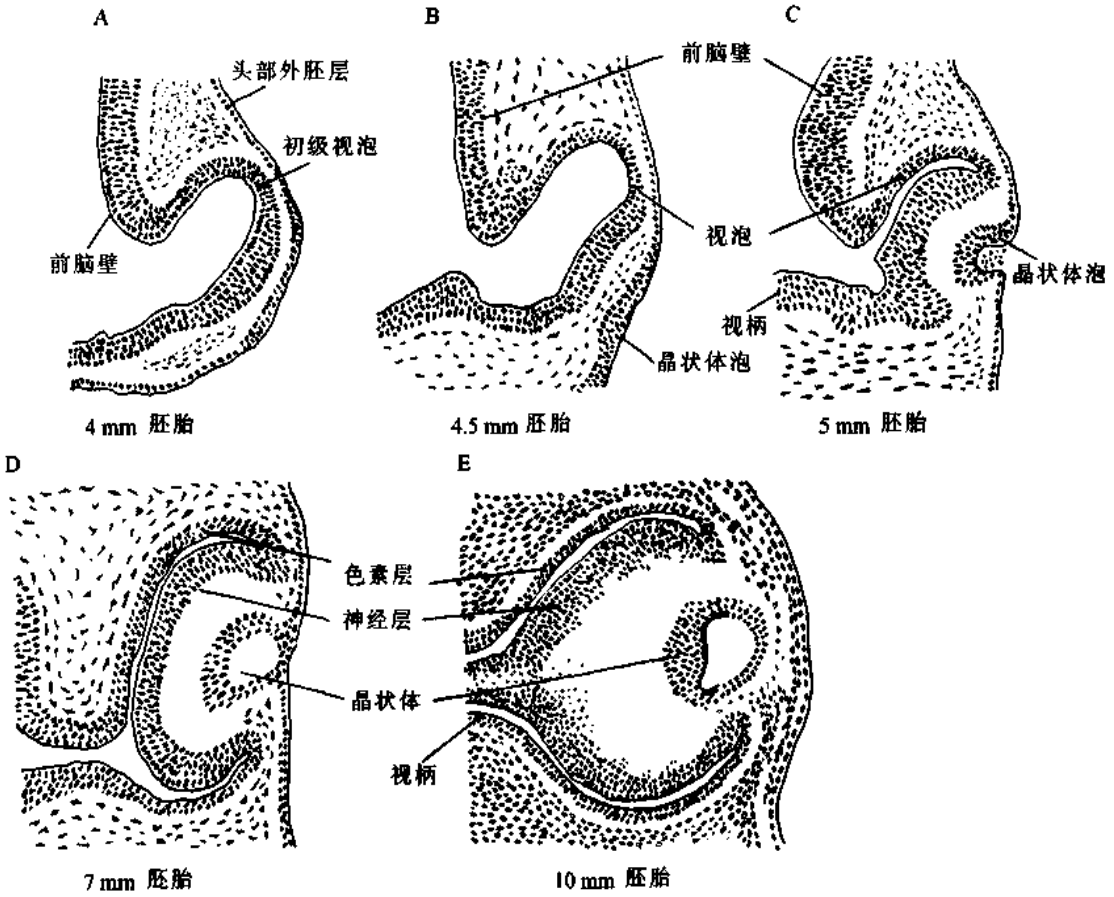


图 12.1　脊椎动物眼的发育

A. 视泡从脑壁外突并与覆盖的外胚层接触　B,C. 随着视泡内陷覆盖的外胚层分化为晶状体细胞　D. 随晶状体的内陷,视泡分化为神经视网膜和色素视网膜　E. 随着视柄发育能将神经冲动从眼输送到脑,视网膜和(或)晶状体诱导覆盖的外胚层变为角膜

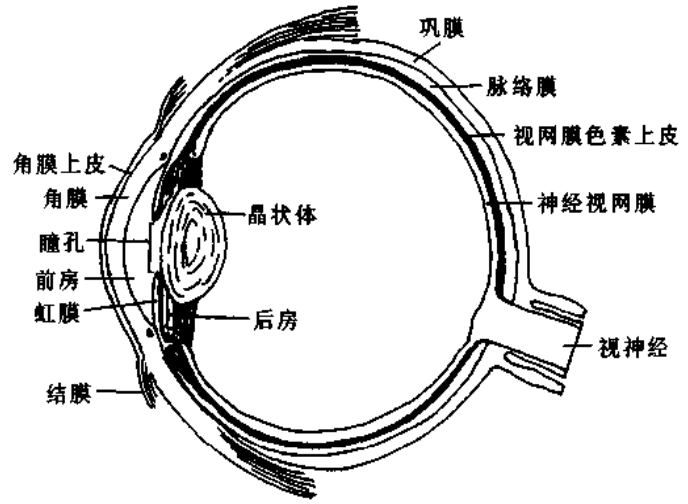


图 12.2　脊椎动物过眼切面的图解,示眼主要结构间的相互关系

在晶状体和神经视网膜间的大室中含有玻璃体

sic ocular muscles)来源于头部的轴旁中胚层。

第二节　视泡发育的机制

引起间脑壁外突形成视泡的确切因素尚不清楚,但已知眼原基的定位是在其下面的原肠顶的诱导作用下形成的。两栖类的眼原基最初位于神经板的最前端，呈卵圆形，彼此相近地排列在中线两侧(图 12.3)。

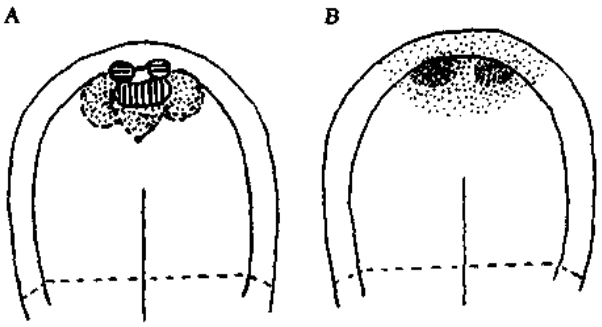


图 12.3　在有尾两栖类神经胚早期眼原基的定位

A. 垂直阴影线:美西螈;黑点:蝾螈　B. 此期成眼潜能的分布——黑点的密度与从神经板的不同区域发育为眼的频率一致

一、控制视泡形成的因素

形成视泡的潜能并不严格局限于活体的神经板区域,当把神经板和其下方的中胚层间质以不同的比例结合在一起进行体外培养时，也常会发育出眼的结构。视泡的形成证明受下列因素的控制。

1. 间质

聚集在视泡周围的间质对视泡的正常发育具有十分重要的作用。如将间质除去，则视泡的发育就不正常或发育的频率不高。实验表明，将美西螈神经板前部两侧区域和其下的中胚层间质共同培养时，视泡的发育频率较高(54.4%)。而没有间质单独培养神经板时，则频率较低(11.1%)。当把眼原基处的一小片组织移植到头后部中胚层上面的神经板区时，则眼的发育受到抑制。这说明形成眼原基的一些因子集中在神经板的前部区域。在神经板眼原基下面的中胚层，即索前板(prechordal plate),还具有控制眼发育数目的作用:当只移植神经板的前部而不加索前板中胚层单独培养时，则只发育出一个眼;加上索前板中胚层，则发育出两个眼。在活体，如将头部前方的中胚层索前板部分除去，就将不同程度地发育出单眼。这可能是由于神经板前部下方的索前板中胚层抑制眼的形成。在除去索前板时，两侧眼原基消除了中间的抑制作用而共同合并形成单眼。当索前板存在时，由于中间的抑制作用两侧的眼原基分别发育而形成双眼。

2. 细胞粘着

视泡细胞表面粘着性的变化可能和视泡的外突和视杯的形成有关。实验证明，在正常发育中

视泡与晶状体外胚层的暂时性地紧密粘着，是完成视泡内陷为视杯和保持视杯的正常形态的必要条件。

3. 脑脊液的积聚

因为视泡通过视柄与脑室相通，如果把细玻璃管插入视泡内阻止液压的形成，则发育的眼不正常。说明视泡的膨胀长大依赖于脑脊液在视泡内的积聚。

二、视泡的分化和自我调整

视泡发育为视杯后由内外两层组成，内层分化为神经视网膜，而外层分化为色素上皮。在发育早期它们的发育潜能是相等的。如果把两栖类视泡期或视杯期的一片色素上皮或是神经视网膜单独移植到胚胎头部的不同区域，结果都能分别进行调整，分化为既具有神经视网膜又具有色素上皮的结构，有时甚至形成小的视杯。同样的情况也见于鸡胚。如将早期鸡胚的眼原基分为两半，则发育出两个互相靠近的正常眼。这表明色素上皮和神经视网膜可以互相转化和进行自我调整。既然组成视泡的各部分是等能的，那么它们是受什么条件影响分化为神经视网膜和色素上皮的呢？

1. 与外胚层的接触

实验证明，眼原基(视泡或视杯)与外胚层接触的区域可分化为神经视网膜。在正常发育中，视泡外突和预定晶状体板外胚层接触的区域形成神经视网膜。这时发生相互的诱导作用：视泡诱导预定晶状体外胚层形成晶状体，而预定晶状体外胚层又反过来诱导视泡与其相接触的部分内陷，并分化为神经视网膜。在体外移植时发现，听泡上皮也具有同样的能力。如将视杯移植到听基板(otic placode)附近时，它可诱导色素上皮发育出额外的神经视网膜。在正常发育中，神经视网膜可能对色素上皮分化的等能性潜力有抑制的作用，故它只能发育为色素上皮。而当视泡和其他上皮结构接触时，均可克服神经视网膜的抑制作用，由色素上皮分化出额外的神经视网膜。

2. 间质影响色素上皮的分化

如果在生理盐水中单独培养视泡，它将成为一团致密的细胞，且总是只分化为神经视网膜。但是，当在体外条件下，将美西螈的眼原基包在同期胚胎的腹部表皮内培养时，因为有间质存在，眼原基膨大为泡状，且只有色素上皮组成。当将两栖类的视泡移植到胚胎的不同部位，或与不同量的间质共同培养时发现，视泡周围间质的量与色素上皮分化的程度相关。间质在影响色素上皮的分化中可能起两个作用，一是使色素上皮变薄，这主要是它参与基膜的形成以固定上皮的状态并抑制上皮的有丝分裂，二是间质的代谢特点。当将眼原基与血管直接接触时，即使没有间质的存在也能发育出色素上皮。这说明氧化过程在色素上皮分化中的重要性。两栖类和鸟类都有这种现象。

3. 神经视网膜的分化

因为视网膜是由脑壁向外突出形成的，所以像大脑和小脑的皮层一样，神经视网膜发育成不同类型神经元的分层排列(图 12.4)。这些层包括最外侧对光和颜色敏感的感光细胞，视杆(rods)和视锥(cones)，内侧的神经节细胞(ganglion cells)，处于中间的，传递神经冲动从视杆和视锥到神经节细胞的双极中间神经元，以及水平地传递神经冲动的无长突神经元和水平神经元。为了保持视网膜的完整性，中间还有大量的神经胶质。

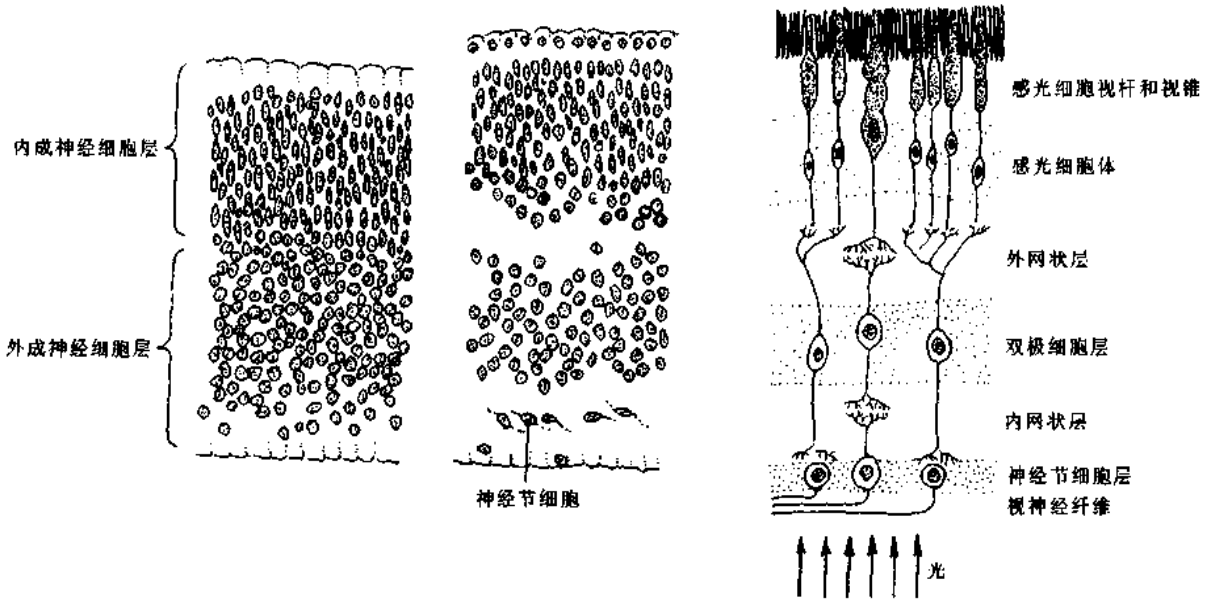


图 12.4　人类视网膜的发育

在发育期间视网膜神经元分类成不同功能的各层

A,B. 在视网膜中成神经细胞开始分离　C. 在成体的视网膜中三层神经元和在它们之间的突触层　D. 在视网膜中主要的神经元通道的功能图解，光穿越各层直到被感光细胞接收，感光细胞的轴突与双极神经元形成突触连接，后者将神经冲动传递到神经节细胞。神经节细胞的轴突集合形成视神经进入脑中

在视网膜发育的早期，细胞从生发层分裂、迁移，细胞分化为不同的类型以及程序化的细胞形成神经视网膜分层的模式。这个高度有序的组织结构是发育神经生物学持久研究的一个问题。现代研究证明，单个的视网膜成神经细胞前体能产生至少三种类型的神经元或两种神经元和一种神经胶质细胞。这种分析是用极精巧的技术标记一个特定前体细胞产生不同细胞得到的(图 12.5)。将一种能聚集到 DNA 中的病毒注射到新生大鼠眼后部仍在发育的视网膜中。这种病毒含有一种在大鼠中不存在的 β－半乳糖苷酶基因，它可在被感染的细胞中表达。在感染大鼠眼后一个月，取下视网膜，染色显示 β－半乳糖苷酶的存在。只有被感染的细胞的后代被染成蓝色。图 12.5B 显示从一个被感染的前体细胞产生的一串细胞。它们被发现是 5 个视杆细胞、一个双极神经元和一个视网膜神经胶质细胞(Müller's cell)。这些结果提示视网膜中各种细胞类型没有特异的细胞前体，所有这些前体细胞都是全能的。另外，干细胞的命运并不是在早期决定的，而是根据它们在视网膜中所处的位置进行分化的，因此其发育是调整型发育(regulative development)。

在视网膜的三种主要的神经元类型(神经节细胞、双极神经元和感光细胞)中，感光的视杆和视锥细胞可能是最后完成分化的神经元。新生儿为什么看不清？据研究是由于婴儿的视锥直径较大(7.5 μm)，成人仅 2 μm。因此在中央视网膜区成人每 100 μm 长度中有 42 个感光细胞，婴儿只有 18 个。另外，婴儿的感光细胞发育也不完全，婴儿在出生后大约要经过三年时间其感光细胞才能发育完全。随着感光细胞的发育，这些外部神经元的细胞体产生一个细胞质突起，其中含有几种特化的细胞器。这些细胞器使突起伸长，并调节感光区的大小和形状。这些细胞的细胞膜自身折叠形成一些囊，感光色素位于其上。光诱导这些色素发生化学变化，同时引起膜电位的变化。这种膜电位的变化影响将神经递质释放到一组双极细胞，它们将电信号输送到神经节细胞。神经

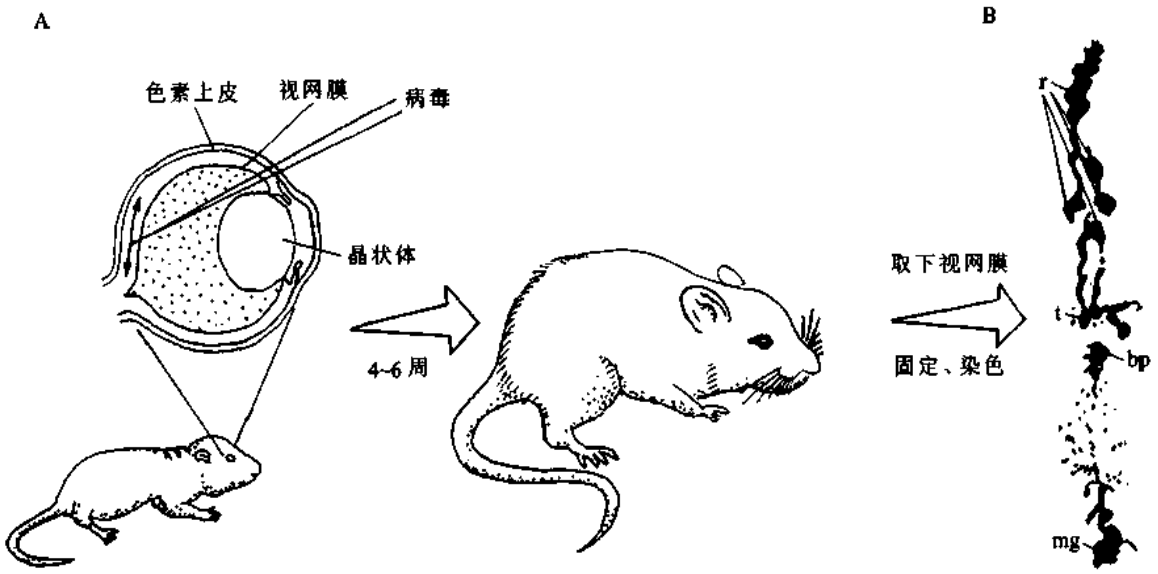


图 12.5 在大鼠视网膜中确定一个前体细胞的谱系

A. 此技术是通过将含有功能活性的 β-半乳糖苷酶基因的一种病毒，注射到眼的背后以感染一些视网膜前体细胞。在一个月到6周以后，取出眼，将视网膜染色显示 β-半乳糖苷酶。 B. 染色的细胞横穿神经视网膜形成一串，其中有5个视杆(r)，一个双极神经元(bp)，一个视杆的终末(t)和一个缪勒神经胶质细胞(mg)。这些细胞是由相差显微镜识别的

节细胞通过其轴突形成的视神经将信息传送到脑。

4. 视网膜-顶盖投射的形成

大多数关于视觉系统发育的研究是用低等脊椎动物，最常用的是爪蟾、豹蛙和金鱼。这些动物视网膜的神经纤维伸向脑的特定区域——视顶盖(optic tectum)，这种神经分布的模式称为视网膜顶盖投射(retinotectal projection)。在鱼类，顶盖是一种成对的结构，所有来自左视网膜的视神经纤维投射到右顶盖，所有来自右视网膜的神经纤维投射到左顶盖。因此视网膜神经节细胞的轴突沿间脑一侧到达视交叉(chiasm)后进入对侧顶盖(图 12.6)。

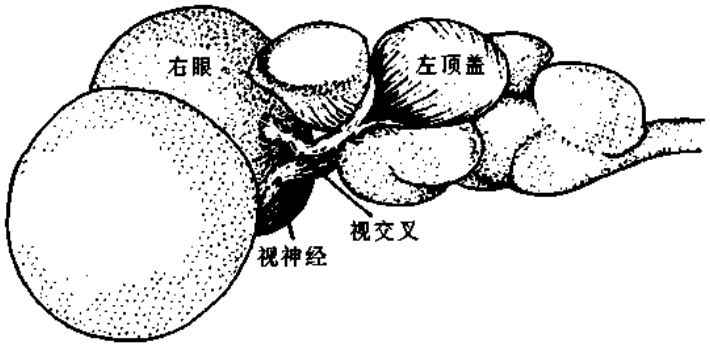


图 12.6 图示鱼类的视网膜-顶盖系统(侧面观)

视神经在视交叉处完全交叉，并分布到对侧的顶盖中

在视网膜神经节细胞的轴突与顶盖建立突触(synapse)连接之前，它们必须从眼穿过视束(optic tract)生长。如果将视束切下并旋转 90°，当生长的轴突到达已旋转的视束时，它们能根据视束旋转的方向，向左或向右偏转，最后仍能到达顶盖。这提示在轴突生长的路径中存在引导的线索，视网膜轴突根据它们提供的线索到达顶盖。一旦轴突到达顶盖，它们以极其可调整的模式建立精确的视网膜顶盖突触连接(参阅第十章及图 10.34)。这种视网膜的轴突末梢(axonal terminals)在顶盖上精确的形态分布主要用两种方法测定。一种方法是用染料标记视网膜神经节细胞及其纤维，追踪它们在顶盖上的神经分布。另一种方法是用电生理学的技术，将细的光束聚焦于麻醉动物视网膜的一个点，同时用微电极记录顶盖上相应位点的活动，找出与视网膜刺激位点对应的顶盖位置。通过以上方法可以发现在视网膜神经节细胞与它们在顶盖上的投射之间存在点对点的特异性。

现在关于发育中视网膜顶盖投射的研究认为，视网膜顶盖精确连接的形成受以下因素的影响。

(1) 化学亲和性

化学亲和性(chemoaffinity)学说认为存在一些本质上是生物化学分子的物质，它们引导生长的神经纤维到达顶盖的合适靶区(参阅第十章)。当用取自眼原基不同部位的类似大小的组织片代替爪蟾蝌蚪的 1/4 到 1/3 眼原基，采用颞侧代替鼻侧或背侧代替腹侧，以及相反的各种组合(图 12.7)。然后用电生理学的方法，在发育的不同时期检查视网膜顶盖投射，发现移植片的视网膜顶盖投射是根据它们起初的定位，而不是移植后的位置。后来将取自视网膜一定部位的神经节细胞用荧光染料标记，并将其移植到未标记的受体视网膜中，不论位置正确与否，移植的细胞根据它们在供体中的位置投射到顶盖的合适位点。这些研究结果提示，视网膜细胞能识别顶盖上的某种线索，并引导它们的神经支配。

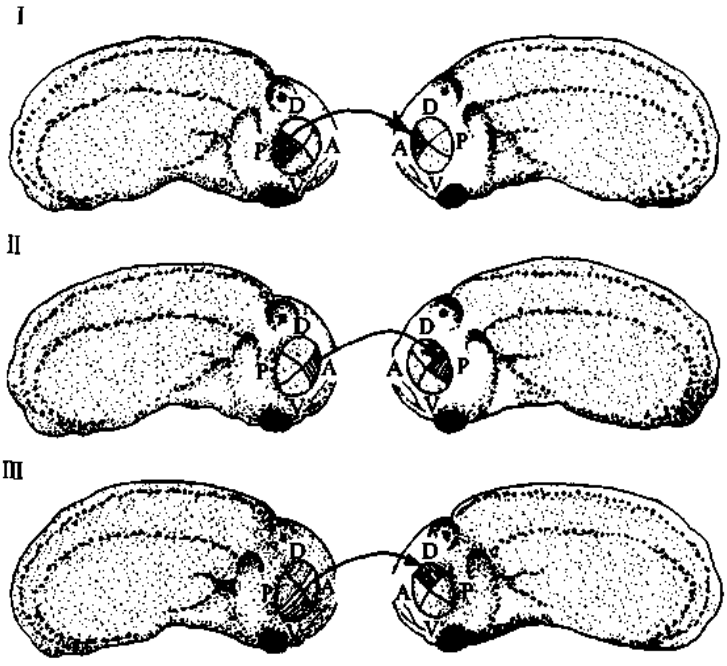


图 12.7　爪蟾胚胎眼原基组织片的手术过程

Ⅰ. 用后侧(P)代替前侧(A)　Ⅱ. 用前侧(A)代替后侧(P)　Ⅲ. 用腹侧(V)代替背侧(D)

P、A、V、D 代表眼原基组织片

(2) 细胞的粘连性

这种细胞粘连的亲和性使视网膜神经节细胞的生长锥(growth cone)能识别顶盖上的合适靶区。如将放射性同位素标记的视网膜神经节细胞加入到分离的顶盖细胞中,结果发现视网膜背侧的细胞可以较好地粘连于顶盖腹侧,而视网膜腹侧的细胞较好地粘连于顶盖的背侧。粘连的选择反映了正常的视网膜顶盖投射。

另外还发现由视网膜特定区域神经节细胞发育的轴突,优先生长到培养的特定顶盖细胞膜上。如鸡颞侧视网膜神经节细胞的轴突优先生长到顶盖前部的细胞膜上,而鼻侧视网膜细胞的轴突不能区分视网膜的前部和后部。颞侧视网膜神经节细胞对前部顶盖细胞膜的优先选择沿顶盖前后轴以等级形式分布。用抗鸡视网膜的单克隆抗体发现一种抗原,它在 14 天龄的鸡视网膜中以梯度形式存在,其浓度在背部视网膜比在腹部视网膜中高 15 倍(图 12.8)。这种抗原被称为 TOP(toponymic)。此后证明 TOP 也以梯度形式在发育的鸡顶盖中存在,但与视网膜中的极性相反,其在腹侧顶盖比在背侧顶盖中高 10 倍。这种颠倒的梯度分布形式与视网膜顶盖连接的模式相关。

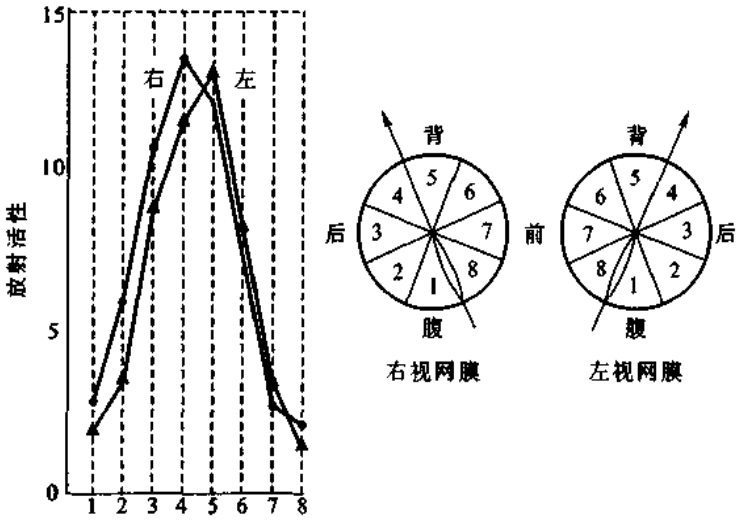


图 12.8 视网膜细胞上 TOP 分子的分布

首先将视网膜分为相等的 8 部分,然后将每一部分解离为单个细胞,并把它们放入用放射性同位素标记的 TOP 抗体的悬浮液中处理一段时间后,测定细胞结合的放射活性。横坐标数字代表与视网膜组织片相同的序数。结果显示在视网膜背侧的组织片中 TOP 含量比腹侧的多约 35 倍

(3) 发育时期

视网膜神经节细胞可能以发育的不同时期向外生长,那些首先到达顶盖的神经纤维与它首先遇到的第一个顶盖细胞形成突触连接,而后到达的纤维生长到较远的,还未被占据的位点。如切下爪蟾尾芽期(25 期)胚胎背部或腹部的半个眼,将其在^{3}H-脯氨酸中孵育 15 分钟,然后洗净并将标记的半眼移植回胚胎(图 12.9A)。从标记半眼生出的纤维可用放射自显影技术追踪。结果发现,背部半眼首先生出神经节细胞轴突,离开眼球进入视束,比腹部视网膜神经节细胞的轴突提前 6 小时到达顶盖。首先背部的视网膜神经节细胞与腹中侧顶盖建立突触连接(37/38 期),然后腹部视网膜神经节细胞与背中侧顶盖形成突触(40 期)。因此认为时间选择可能是组织视网膜顶盖投射

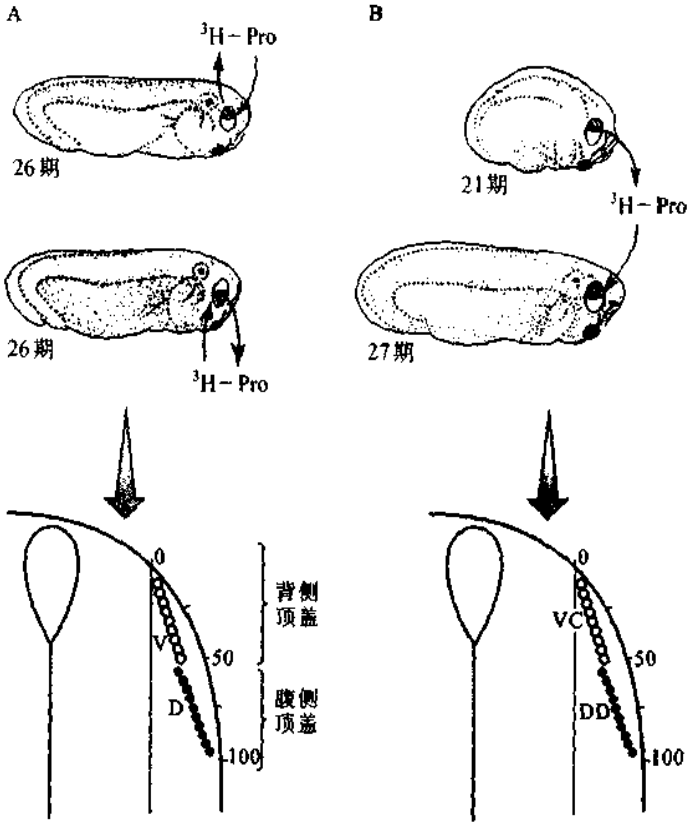


图 12.9　视网膜神经节细胞正确投射到顶盖的时间效应

A. 为确定神经纤维到达顶盖的顺序，将爪蟾尾芽期胚胎的背侧或腹侧眼原基切下，并用^{3}H－脯氨酸(^{3}H－Pro)标记，然后重新塞回胚胎眼中，让视网膜轴突生长到顶盖。标记的神经纤维用放射自显影识别。腹侧视网膜神经纤维(空心圆)分布于顶盖背侧，而背侧视网膜纤维(实心圆)分布于顶盖腹侧　B. 如果将较年幼的(神经胚期)背侧眼原基移植到较晚期胚胎眼原基背侧，其轴突与腹侧的相比将延迟到达顶盖。除了它们到达顶盖推迟之外，背侧视网膜轴突(DD)仍然以正常发育期间相同的模式投射到顶盖腹侧。VC. 腹侧对照的视网膜轴突

的一个因子。

(4) 其他因子

另外，在视神经再生的研究中发现一些其他因子影响再生的视网膜顶盖投射的形成。如最初投射的精确化(refinement)，当再生的轴突到达顶盖后形成茂盛的树状分支(abors)，产生多个分支，此后进一步精确化为更小的突触区，另外过多的采取错误路线的视神经纤维在精确化过程中消失。进一步的研究还证明再生的视网膜顶盖投射的精确化依赖神经活动。当用河豚毒素(tetrodotoxin，TTX)阻断视网膜神经节细胞的电活动时，视网膜顶盖投射的精确化不能进行。但在正常的发育期间神经活动对末梢树状分支精确化的作用还不十分清楚。首先，视网膜在顶盖上形成起初的图形是非常有序的，不像再生早期出现许多错误。第二，如果在已建立视网膜顶盖投射时将美西螈用河豚毒素处理，其视网膜顶盖投射与对照动物的基本相同。所以再生的轴突可能并不完全遵循发育期间神经纤维生长的线索，如果要了解发育期间指引视网膜轴突的线索，必须研究发育系统，而不

是再生系统。

第三节 晶状体发育的机制

在活体情况下，晶状体是一种无血管的透明组织，是由一种细胞分化而来。因此它成为研究细胞分化，特别是在分子水平上进行研究的一个理想的实验模式。又因为晶状体接近胚胎表面（早期它直接位于胚胎表面），易于进行实验操作，所以近一个世纪以来对晶状体发生进行了广泛深入的研究。

一、晶状体的决定和诱导

形成晶状体的细胞来自与间脑的视泡相接触的头部外胚层的一个特定的区域。有关晶状体决定的工作（图 12.10）是由 Spemann（1901）首先实验测定的。他用灼热的针破坏蛙（*Rana temporaria*；以前称为 *Rana fusca*）早神经板期胚胎的眼原基。在完全成功地破坏预定眼的例子中，晶状体不发育。因此他提出，至少在 *Rana temporaria* 中视泡与位于其上的外胚层的接触是晶状体形成所要求的。此后不久，Lewis（1904）认为视泡在晶状体形成中起一种极其重要的作用。他将 *Rana palustris* 晚神经胚的视泡取下，把它向后移植到头部正常不形成晶状体的外胚层下。结果外胚层发育出晶状体的结构。他得出结论，视泡不仅对晶状体的形成是必须的，而且能使正常不形成晶状体的外胚层诱导出这种反应。

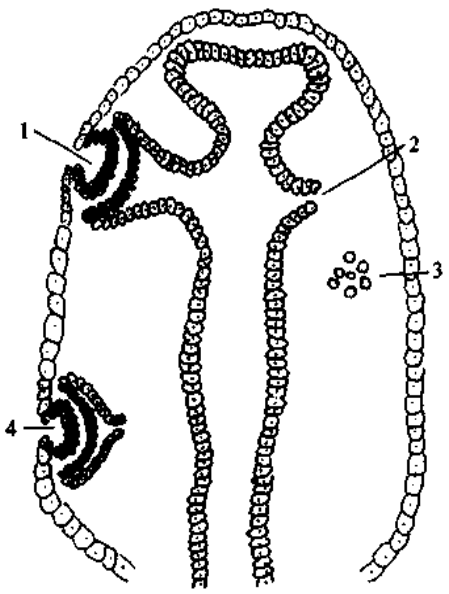


图 12.10 用视泡诱导头部外胚层形成晶状体
1. 正常的诱导 2. 在缺少视泡时，无晶状体形成 3. 用其他组织代替视泡，不产生诱导 4. 将视泡置于相邻头部外胚层的其他区域，在不同地方诱导出晶状体

但是，有人发现在 *Salmo salar* 中，虽然这些鱼没有眼，却具有很好发育的晶状体。因此认为视泡并不是晶状体形成所必须的。此后用 *Rana palustris* 重复 Spemann（1901）的实验时，破坏早神经胚的眼原基，与以前的结果相反，发现在缺少眼存在的情况下仍有晶状体形成。因此，他们认为，至少在某些例子中视泡不是晶状体形成所必须的。

随着在不同的种中更多的资料的积累，似乎存在大量种间差异。一些动物好像不需要视泡就能形成晶状体，而另一些动物晶状体的形成似乎完全依赖与视泡的接触。在 1966 年，Jacobson 结合更多的资料提出，形成晶状体的外胚层相继与预定前肠内胚层，预定心脏中胚层和视泡接触。它们中的每一种都以附加的方式在诱导晶状体形成中起作用。在某些种中，晶状体诱导阈值是低的，只与内胚层接触就已足够了。而在其他的种中，晶状体诱导阈值是高的，所有三种诱导者都必须具有活性。在后者晶状体诱导好像是依赖于视泡，但实际上，视泡只是三个诱导者中的最后一个（图 12.11）。虽然不排除内胚层和中胚层的作用，但

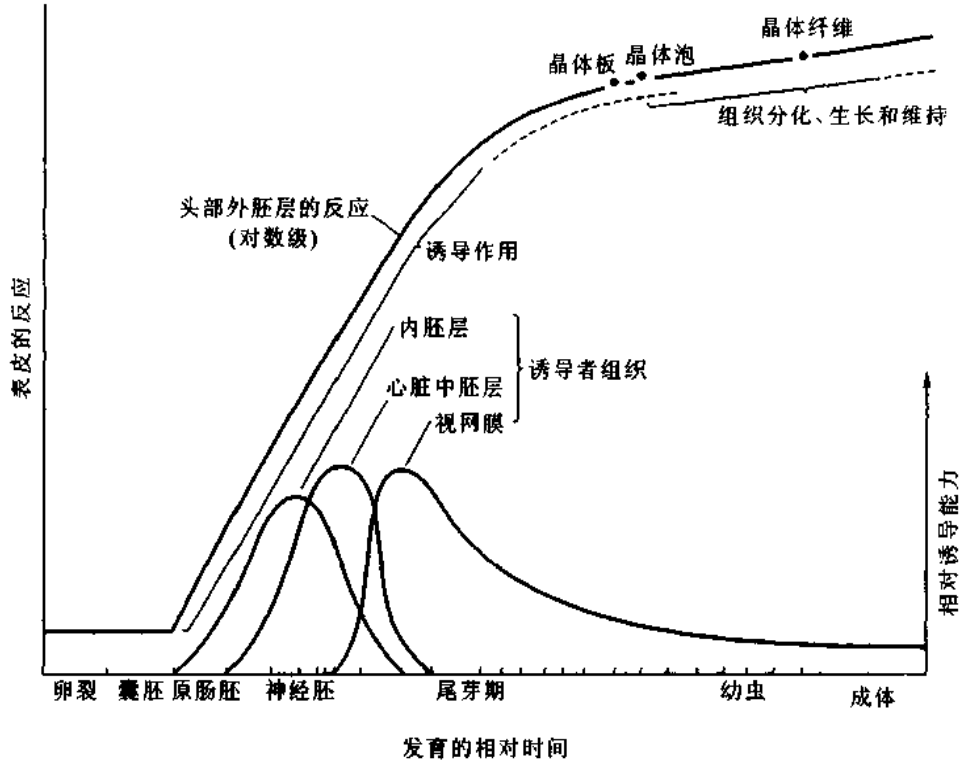


图 12.11　蝾螈晶状体诱导图解

最近在爪蟾进行的研究强调前部神经板作为晶状体外胚层早期诱导者的重要性。实验表明，预定晶状体外胚层在发育的很早时期(晚原肠胚到中神经胚期)就接收了变为晶状体的能力，而视泡仅仅是最终使这个已经独立存在的组织分化。换句话说，预定晶状体外胚层将在没有视泡的接触下形成晶状体，但视杯对晶状体的完全分化和眼其余部分的合适定位是必须的。这种模式(图 12.12)划分晶状体的决定为三个时期，即感受性、倾向性和最后的决定。对起初的诱导信号起反应的感受性被认为是在外胚层中独立存在的过程，产生晶状体的倾向是由前神经板提供的，而最后的决定是被视泡诱导的。

1. 外胚层的感受性和倾向性

通过移植的实验证实，在爪蟾的发育中形成晶状体能力的决定发生得很早。通过移植原肠胚各种不同区域的外胚层到神经胚晶状体形成的区域处，发现从非常年幼的原肠胚来的外胚层与视泡接触时不形成晶状体。然而当移植较晚的神经胚期的预定晶状体外胚层到神经胚的同一个区域时，它们能通过与视泡起反应形成晶状体(表 12.1)。其他组织不能以这种方式起反应。原肠胚的外胚层具有极有限的形成晶状体的能力，但是这种有限的能力也随着发育而逐渐丧失了。那么显然预定晶状体外胚层在它与视泡接触以前很久就获得了形成晶状体的能力。新的实验结果提示，从神经板发出的一个信号能穿过外胚层运动。如将晚原肠胚的预定神经板前部区和最后将形成晶状体的区域分离和重组。当单独培养预定晶状体外胚层时，它并不形成晶状体蛋白，而当它与预定神经板前部区接触培养时，确实有晶状体蛋白形成。虽然晶状体的分化常常在发育上是不完全的，但晶状体蛋白的形成却是非常特异的。当这个原肠胚的外胚层与其他组织，包括前肠内胚层和心

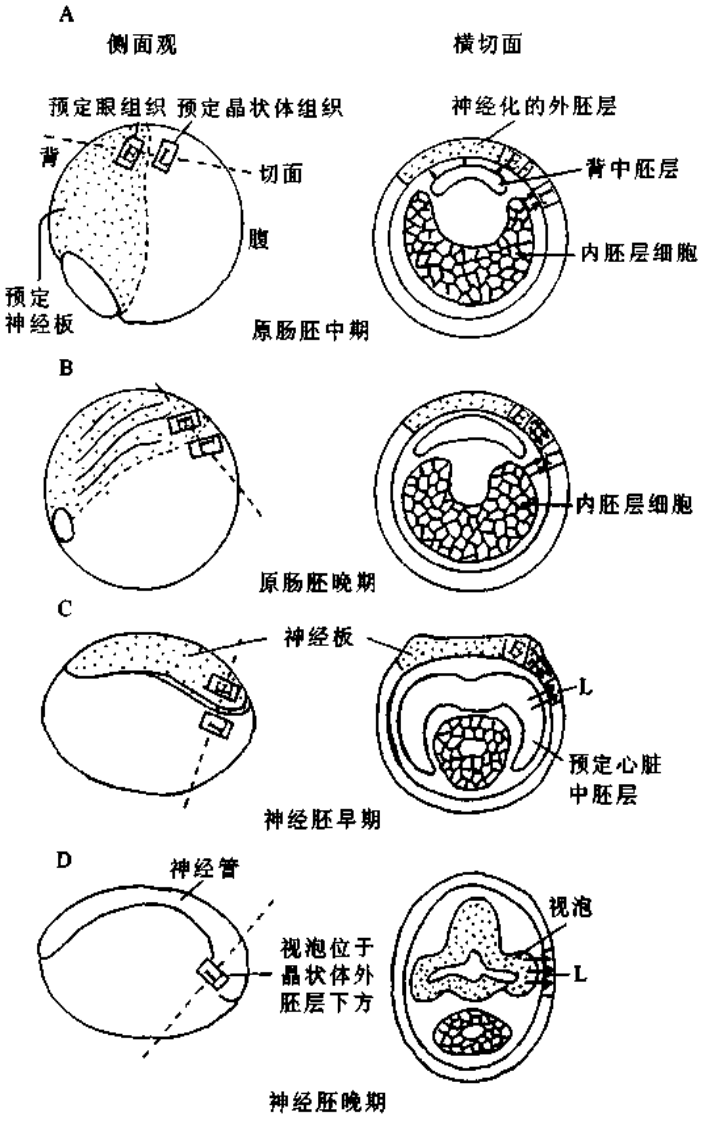


图 12.12 晶状体诱导的一种现代模式

A. 在原肠胚中期，形成晶状体的外胚层变得对诱导晶状体的信号具感受性 B. 在原肠胚晚期，来自已神经化的外胚层（更像是预定眼区）的一种信号诱导预定形成晶状体的外胚层 C. 在神经胚早期，这个来自前侧部中胚层的诱导信号加强 D. 在神经胚晚期，视泡与形成晶状体的外胚层接触，以信号通知外胚层分化为晶状体

脏中胚层结合时，不形成晶状体蛋白。这些实验证明，预定神经板的前部（包含视网膜原基）提供一个信号，使这种组织倾向于变为晶状体。实验证明，并不是所有的组织都能对神经板前部的信号起反应。只有中、晚期原肠胚的外胚层有能力对这个信号起反应。通过把不同时期原肠胚的外胚层移植到神经板期胚胎的预定晶状体区，用检测晶状体蛋白的方法发现，早原肠胚的外胚层几乎没有形成晶状体的感受性。但从稍晚期胚胎来的外胚层能形成晶状体。到原肠形成结束时，对神经板前部的信号起反应的能力已经丧失。这种感受性被认为是外胚层本身固有的，而不是被周围的组织诱导的。因此，外胚层在较早的原肠胚中期获得对来自神经板前部的诱导信号起反应的感受性，

而在原肠胚晚期神经板前部在这个组织中诱导一种形成晶状体的倾向性。类似的实验证明，在同一时期的背侧部中胚层不诱导形成晶状体的倾向性，却将增强由神经板给予的形成晶状体的倾向性。

表 12.1　随年龄预定晶状体外胚层的感应性增加

供体时期	受体时期	检查的数目	诱导的晶状体/%	类晶状体/%	外胚层增厚/%	无晶状体/%	无感应/%	总的阳性反应
原肠胚中期	神经胚	24	0	4	38	8	50	1(4%)
原肠胚晚期	神经胚	21	10	14	42	10	24	5(24%)
神经胚早期	神经胚	24	75	8	0	4	13	20(83%)
神经胚晚期	神经胚	20	95	5	0	0	0	20(100%)

2．晶状体的最后决定

虽然在爪蟾的晶状体形成中视泡好像并不起一种主要的作用，但它在表达完全的晶状体表现型中确实起一种作用。在缺少视泡时形成的晶状体往往是发育非常不完全的。虽然对视泡影响晶状体分化的机制还不太清楚，但已假设，头部的神经嵴细胞阻止晶状体的分化，而与视泡的接触保护晶状体不受这些抑制信号的影响。

二、晶状体的形态发生和有关因素

晶状体的形态发生从预定晶状体外胚层开始，经历晶状体板、晶状体窝、晶状体泡、初级晶状体纤维和次级晶状体纤维等阶段，最后发育为成熟的晶状体。大多数脊椎动物晶状体发生基本相同，但两栖类不经过晶状体窝阶段，增厚的晶状体板分为内，外两层，内层发育为中空的晶状体泡，外层成为预定角膜上皮。在晶状体发育过程中最明显的变化之一是细胞的伸长。首先预定晶状体外胚层细胞伸长形成晶状体板，晶状体板内陷形成晶状体窝、晶状体泡。此后晶状体泡后部的细胞伸长成为初级晶状体纤维细胞，随着晶状体赤道区细胞的分裂，细胞不断地添加到晶状体的后部，并伸长变为次级晶状体纤维细胞，最后，成熟的初级和次级晶状体纤维细胞在正发育的晶状体内逐步伸长，填充于整个晶状体中。而覆盖于晶状体赤道区前方的细胞则始终保持为晶状体上皮(图 12.13)。与晶状体发生有关的主要因素是：

1．细胞外基质

首先在鸡和小鼠晶状体的形态发生中发现，在视泡和预定晶状体外胚层间含有一些细丝、颗粒和基膜等非细胞的结构。此后的研究证明，这些物质为胶原(collagen)和氨基多糖(glycosaminoglycans)等组成的细胞外基质(extracellular matrix，ECM)。同时指出，这些由上皮细胞分泌的细胞外基质具有促进细胞分化的作用。细胞外基质中氨基多糖浓度的增加与晶状体的形态发生和晶状体特异蛋白质的出现密切相关。

2．微管和微丝

已知微管(microtubule)和微丝(microfilament)与细胞的变形相关。在预定晶状体外胚层与视泡接触以后，预定晶状体上皮细胞伸长形成晶状体板。电镜观察发现，在这些细胞中出现与细胞伸长方向平行的微管。它们与细胞形状的变化有关。晶状体板内陷形成晶状体窝的过程好像是依赖于细胞顶端细胞质内微丝的收缩。

3．细胞增殖

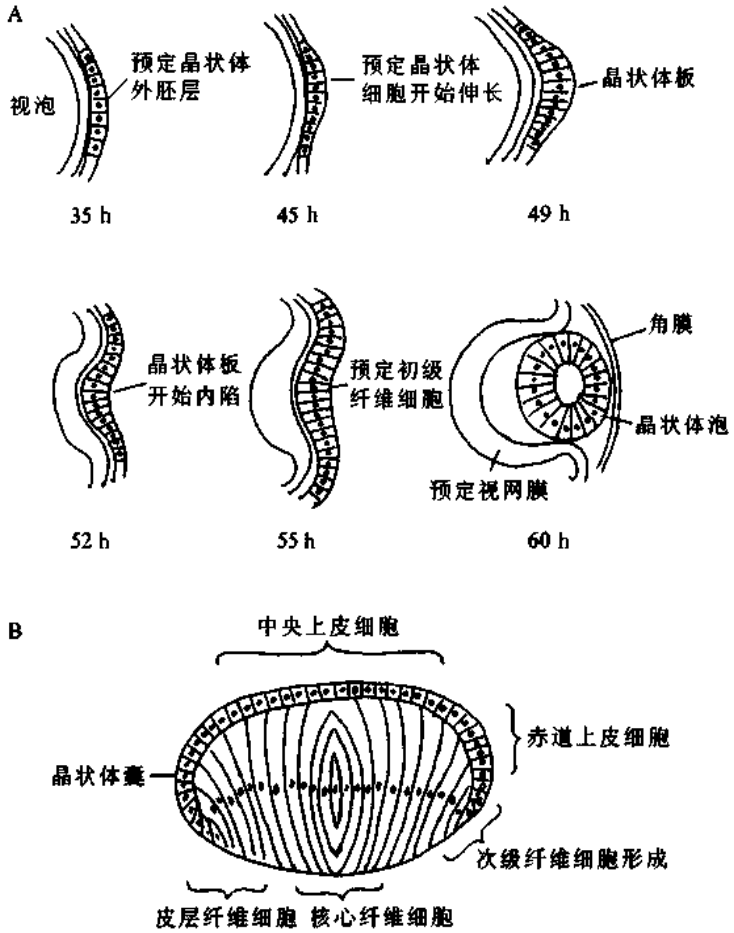


图 12.13 鸡胚晶状体诱导和早期发育阶段(只表示晶状体的发育及形态)

A. 35~60 h 鸡胚晶状体诱导及早期发育图解 B. 15 天鸡胚晶状体图解

在鸡神经胚晶状体诱导期间，发现晶状体原基的边缘是固定的，由于细胞分裂使这群细胞的压力增大，引起晶状体板内陷形成晶状体窝。随着晶状体窝的加深它与周围的表皮外胚层脱离而形成晶状体泡(图 12.14)。此外，还发现在晶状体原基的边缘有细胞坏死区，使晶状体窝很容易与周围的外胚层脱离。另外，当晶状体的细胞增殖模式发生变化时，其细胞分为两类。如大白鼠的晶状体泡形成和生长时，在晶状体泡后部的细胞增殖速度降低并最后停止。于是这部分细胞开始伸长形成初级晶状体纤维。而晶状体前部的细胞仍继续分裂，成为预定晶状体上皮细胞。因此，晶状体就分为两个功能不同的部分：即增殖和伸长的部分。这两部分在解剖学上的分界大致与视杯的边缘相当。晶状体在视杯边缘后方的部分为初级晶状体纤维部分，而在前方部分的细胞构成一层生发上皮，它一直保持分裂，这些分裂中的细胞朝着晶状体的赤道区移动。在它们通过赤道区以后也开始伸长，包在初级晶状体纤维外面形成次级晶状体纤维(图 12.15)。因此，晶状体含有三个区：前部的分裂上皮细胞区，赤道面附近的细胞伸长区和后部和中央的晶状体纤维细胞区。

4. 视杯

晶状体泡伸长的细胞处于视杯包围的内部。由此提示，视杯的环境诱导细胞的伸长和形成初

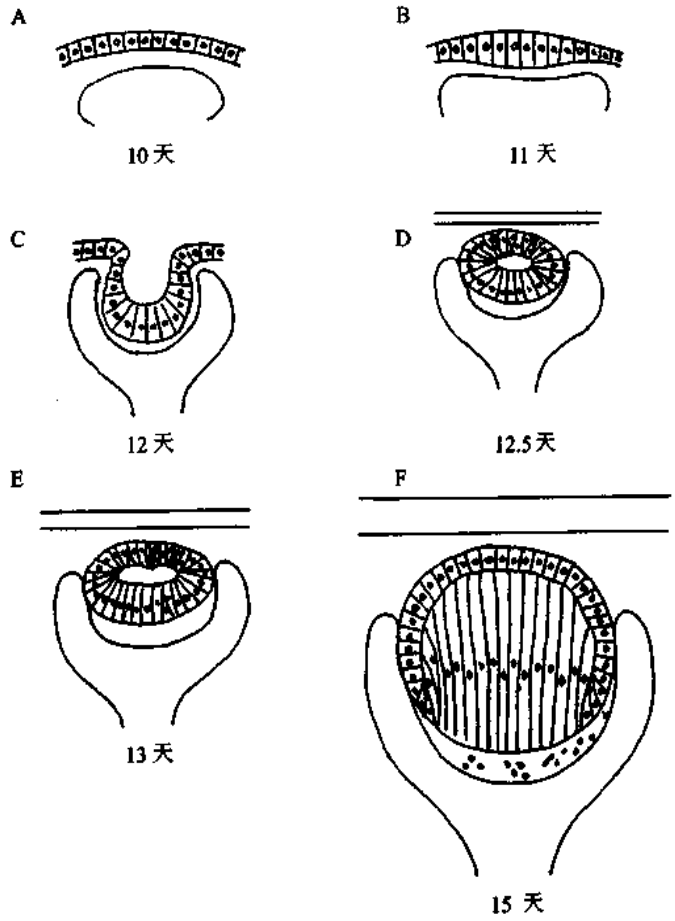


图 12.14　大鼠晶状体发育早期矢状切面图解

由晶状体板(B)形成晶状体窝(C)和晶状体泡(D)。晶状体泡后部细胞伸长，形成初级晶状体纤维细胞(E,F)

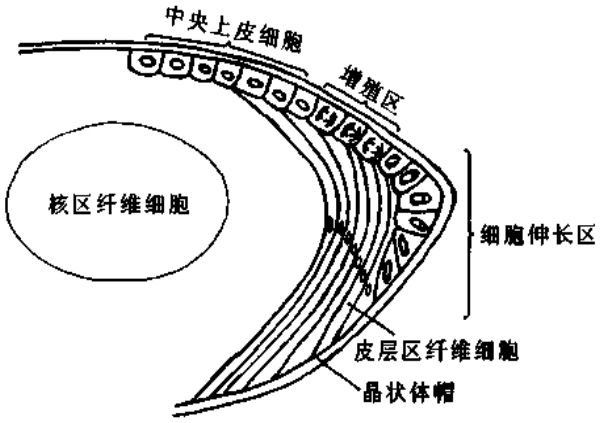


图 12.15　脊椎动物晶状体图解

晶状体由被细胞外基质帽包围的上皮细胞组成。前部具有分裂活动的是生发上皮，由于这些细胞的分裂，它们被推向晶状体的赤道区，并在那里伸长。随着细胞的伸长，它们被在边缘持续分裂和伸长的细胞置换到内部，形成初级晶状体纤维细胞

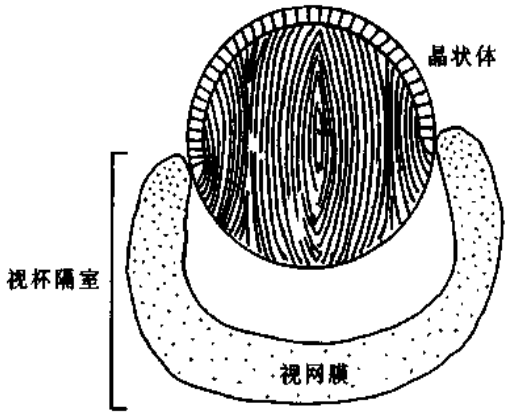


图 12.16　晶状体和视杯关系图解

级晶状体纤维(图 12.16)。如果将 11 天鸡胚的晶状体倒转 180°,使在正常情况下朝向角膜的上皮部分转向朝着视网膜。结果在新的环境中,上皮细胞开始伸长并变为初级纤维细胞。此后有人在小鼠中也肯定了这个结果。因此,晶状体在形态发生中被视杯分隔对获得和维持晶状体的生长模式是十分重要的。

三、晶状体的细胞分化

晶状体组织分化为能传导光到视网膜的结构,这涉及细胞结构和形状的变化和称为晶状体蛋白(crystallins)的晶状体特异蛋白质的合成。形成晶状体的细胞具有两个主要特征:伸长为纤维细胞的能力和合成特异晶状体蛋白的特性。晶状体蛋白是晶状体主要的和特异的蛋白质,构成晶状体可溶性蛋白质的 90% 以上。晶状体蛋白分为四类:哺乳类、两栖类和鱼类有 α - 晶状体蛋白,β - 晶状体蛋白和 γ - 晶状体蛋白;鸟类和爬行类有 α - 晶状体蛋白,β - 晶状体蛋白和 δ - 晶状体蛋白。检验晶状体蛋白多用抗体免疫荧光技术。

不同的动物在晶状体发育期间,各类晶状体蛋白的合成模式具有空间和时间上的差异。几种动物晶状体蛋白合成的时间及其分布列入表 12.2 中。从表 12.2 中可以看出,哺乳类的 α - 晶状体蛋白最先检出,γ - 晶状体蛋白出现的最晚。鸟类 δ - 晶状体蛋白最早出现。而两栖类尚不一致,在豹蛙中,γ - 晶状体蛋白最早检出,而 α - 晶状体蛋白出现最晚。

表 12.2 几种动物中不同类型的晶状体蛋白合成的时间及其分布

动物	晶状体蛋白	出现时间	分布区域	参考文献
哺乳类	α-	12 天胚胎	晶状体窝	McAvoy(1980)
		14 天胚胎	晶状体全部细胞	
	β-	12 1/2 天胚胎	晶状体泡后部	
	γ-	发育后期新生大鼠	限于晶状体后部伸长细胞	
鸟类	α-	16 期(56 小时)	晶状体窝底部,微量	Ikeda 和 Zwaan(1967)
		19 期(80 小时)	预定上皮细胞,伸长细胞	
		27 期(5 天半)	初级纤维及上皮细胞	
		44 期	仅分布在上皮细胞	
	β-	16 期	少数细胞	Zwaan 和 Ikeda(1968)
		19 期	初级纤维细胞	
		27 期	晶状体全部,赤道区最多	
		44 期	仅在上皮细胞	
	δ-	14 期鸡	晶状体极少数细胞	Brahma 和 Van Boorenmaalen (1971)
		16 期鸡	晶状体窝底部	
		19 期鸡	初级纤维大量,上皮微量	
		27 期鸡	散布在整个晶状体	
两栖类	α-	25 期及较老蝌蚪	晶状体上皮	Yamada(1966)
	β-	较老蝌蚪	所有晶状体泡细胞和刚开始伸长的晶状体纤维中	McDevitt 等(1969)
	γ-	21 期豹蛙	限于伸长细胞和纤维细胞	McDevitt(1972)

四、晶状体蛋白合成的调控

蛋白质合成的调控主要在三个水平上进行:即 RNA 的转录,转录后的调控和蛋白质的翻译。

晶状体蛋白合成的调控也是在这三个水平上进行的。但在不同的水平上有不同的条件进行控制。

1．转录后的调控

现在已确信，mRNA 的稳定性对于形成晶状体纤维是重要的。用放线菌素 D 抑制小牛晶状体的 RNA 合成时，在晶状体上皮细胞内 γ－晶状体蛋白的合成被抑制，而在纤维细胞内不抑制同一种晶状体蛋白的合成。因此得出结论，在纤维细胞中 γ－晶状体蛋白是由稳定的 mRNA 合成的。同时也发现，鸡胚晶状体在用放线菌素 D 抑制 RNA 的合成后，仍有晶状体蛋白合成。并证明，14 天鸡胚晶状体中既有半衰期为 3 小时的短寿命 mRNA，也有半衰期为 30 小时的长寿命 mRNA，而晶状体蛋白是由后者合成的。用放射自显影技术进行的实验证明，稳定的 mRNA 仅存在于正在伸长的细胞和纤维细胞中，而在上皮细胞中缺如。上述结果表明，晶状体蛋白的合成包括转录后的调控。

2．转录调控

转录调控对于调节预定晶状体细胞和晶状体上皮细胞中晶状体蛋白基因的表达是重要的。在这个水平上基因表达的调控可能是晶状体蛋白基因的复制或是已存在的晶状体蛋白基因的转录。在鸡胚的研究中表明，晶状体纤维细胞的分化所表现的特点是，δ－晶状体蛋白的合成速度增加和 δ－晶状体蛋白 mRNA 的积累。他们用分子杂交的方法，以纯化的 δ－晶状体蛋白 mRNA 制备 ^{3}H－cDNA，这种 cDNA 是定量测定 mRNA 的优良探针，特别适用于发育期间测定信息的变化。通过用 δ－晶状体蛋白的 ^{3}H－cDNA 和发育中晶状体各部分的 DNA 进行杂交的结果表明，δ－晶状体蛋白的序列包含在鸡胚基因组的单一组分中(而不是重复组分)。而且在晶状体上皮细胞和纤维细胞中没有 δ－晶状体蛋白序列的扩增。因此，在晶状体细胞内 δ－晶状体蛋白 mRNA 的积累和 δ－晶状体蛋白合成速度的增加，不是由于 δ－晶状体蛋白 DNA 的复制。有人还提出另一种可能性，即已存在的基因的转录可能与晶状体形态发生期间，在 δ－晶状体蛋白被检测出来以前的 mRNA 的积累有关。因此，晶状体细胞的分化，至少晶状体蛋白的合成是由那些刺激晶状体蛋白基因转录的条件启动的。

3．翻译的调控

尚无证据表明，活体内晶状体蛋白的合成在 mRNA 翻译水平上的调控。将不同发育时期鸡胚的晶状体 mRNA 分离出来，在体外进行无细胞系翻译，结果发现所翻译的晶状体蛋白产物和各发育时期分离的 mRNA 的产物相似。另外，从 15 天鸡胚晶状体上皮细胞和纤维细胞分离出的 mRNA 翻译的产物，反映出这两种晶状体细胞不同的蛋白质组成。但是通过进一步的实验证明，在无细胞系翻译的情况下，K^+ 和 Mg^{2+} 水平的轻微变化都会影响不同信息的翻译。如在培养的鸡胚晶状体中，δ－晶状体蛋白合成的调控与 K^+ 和 Na^+ 之比有关。活体内晶状体蛋白的合成是否受这种机制的控制尚不清楚。但一个有意义的事实是，细胞内 K^+ 和 Na^+ 水平的变化可能在发生白内障期间及正常晶状体细胞分化期间晶状体蛋白合成的调节有关。

4．影响晶状体蛋白合成的其他因子

(1) 细胞增殖周期

与晶状体细胞分化相关的细胞机能之一是细胞增殖周期。研究发现，在晶状体赤道区伸长细胞内有丝分裂的停止和 β－晶状体蛋白检出之间存在密切的空间关系。在晶状体泡伸长细胞内细胞增殖的减慢与这些细胞内 β－和 γ－晶状体蛋白的合成是一致的。与此类似，在豹蛙晶状体发育期间和蝾螈(*Triturus viridescens*)的晶状体再生期间也有类似的情况。以上结果说明，细胞周期

或细胞周期的一定时期可能直接或间接地与一些晶状体蛋白的合成有关。

(2) 细胞形状的变化

在晶状体细胞分化期间细胞形状的变化以及与此有关的条件和晶状体蛋白的合成也相关。实验证明，凡是能破坏微丝和阻止其形成丝状结构的细胞松弛素 B 的浓度，在体外培养条件下可抑制大白鼠晶状体上皮细胞内 γ－晶状体蛋白的合成和细胞的形态分化。在体外培养条件下，用秋水仙素抑制鸡胚晶状体细胞的伸长，但并不影响 δ－晶状体蛋白的合成和 δ－晶状体蛋白 mRNA 的积累。因此，在培养的鸡胚晶状体细胞中微管结构(与细胞伸长有关)可能和 δ－晶状体蛋白基因的表达无关。以上有关细胞形状的研究表明，大白鼠晶状体细胞在培养条件下，微丝的结构以某种方式与 γ－晶状体蛋白的合成相关。

第四节 晶状体的再生和转分化

一、晶状体再生

晶状体再生首先在蝾螈中发现。当将成体蝾螈的晶状体除去以后，可从虹膜的背缘再生出新的晶状体，这一现象被称为乌尔夫氏晶状体再生(Wolffian lens regeneration)(图 12.17)。虹膜与晶状体有明显的不同，虹膜主要由色素细胞组成，它们含有大量的色素并且不能分裂。在除去晶状体以后，虹膜背缘细胞的色素开始减少，细胞分裂加快，并逐渐变得透明和开始合成晶状体蛋白，形成晶状体细胞。移植实验证明，只有虹膜背缘的细胞具有这种能力。除去晶状体后，当将虹膜的其他区域移植到背部时，不能再生，而当将虹膜的背缘部分移植到其他位置时，也可再生出晶状体。但是，如果不除去晶状体，不论将虹膜背缘部分移植到那里，都不能形成晶状体。即使在除去晶状体以后，如果一直向眼球内注射完全的(含有晶状体的)眼球液，在注射期间虹膜背缘也不会再生出晶状体。以上结果表明，虹膜背缘部分本来就具有形成晶状体的能力，但在晶状体存在的情况下这种能力被抑制，而在除去晶状体消除了这种抑制作用后，虹膜背缘再生形成晶状体的能力才显示出来。虹膜背缘再生为晶状体的能力是在幼虫阶段获得的，并一直保持到成体。晶状体再生被认为是一种组织变形(metaplasia)，它是指一种已完全分化的细胞类型转变为另一种类型。爪蟾蝌蚪也具有再生晶状体的能力，但它是由角膜上皮再生的。

二、转分化

转分化(transdifferentiation)是指由一种部分分化了的组织的细胞转化为另一种组织类型的充分分化的细胞。如除了由虹膜可再生为晶状体外，还可从神经视网膜和色素上皮分化为晶状体或类晶状体(lentoid)，后者是一种由含晶状体蛋白的晶状体纤维细胞组成的结构。近年来利用脊椎动物胚胎或成体的眼组织，在活体内及体外培养条件下做了大量转分化的研究。转分化的研究有助于从细胞及分子水平上了解细胞分化的基本机制。

三、晶状体再生和转分化的有关因素

1. 晶状体蛋白 mRNA

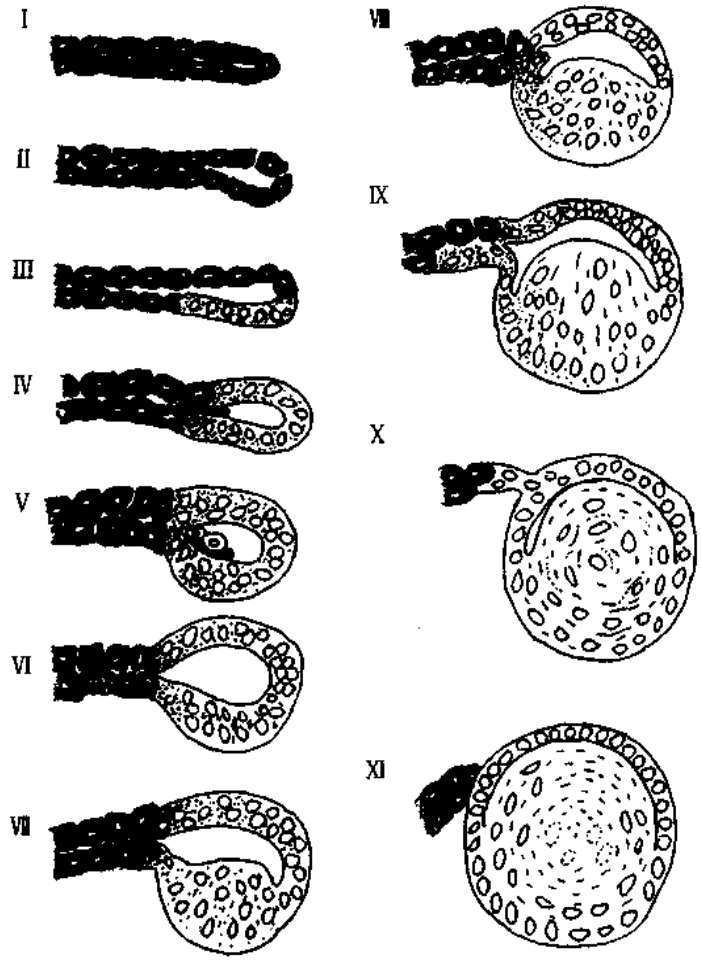


图 12.17　成体蝾螈乌尔夫晶状体再生阶段图解

再生阶段以罗马数字表示。黑色细胞表示色素虹膜细胞，白色细胞表示脱色素的再生细胞

眼的非晶状体组织中必须含有晶状体蛋白的 mRNA 才能发生转分化。利用分子杂交的方法，以纯化的晶状体蛋白制备 cDNA，用它和从眼各部分提取的 RNA 进行杂交。结果发现，晶状体的总 mRNA 中只含有极少量能与神经视网膜或色素上皮的 RNA 杂交的成分。而在不能转化为晶状体的组织中，如肌肉、肝等则完全没有。这说明在能转化为晶状体的神经视网膜和色素上皮中，正常情况下可能就含有极少量的晶状体蛋白 mRNA。所以这可能就是它们能转化为晶状体纤维细胞的必要条件，或许可作为它们发育潜能的标记。另外，神经视网膜内晶状体蛋白 mRNA 的含量在正常发育过程中逐渐减少，最后消失。这种变化趋势和它对转分化刺激的反应能力是平行的。在体外培养条件下，鸡胚的神经视网膜转分化为晶状体和由色素上皮转分化为神经视网膜的频率均在发育的早期高且速度快，随后逐渐降低，乃至消失。胚胎发育时期，晶状体蛋白 mRNA 水平与神经视网膜细胞转分化能力之间的这种关系，为研究细胞对诱导刺激反应能力的分子基础提供了一些线索。

2. DNA 复制和细胞分裂

在晶状体再生的研究中发现，在除去晶状体后虹膜背缘细胞大量复制 DNA 和随后的细胞分裂。这些细胞从停止的 G_0期被激活进入 G_1期开始增殖。大约经过 5～6 次细胞周期后开始转分化。DNA 的复制也可能是转分化的先决条件之一。因为在体外培养条件下，需要经过长时期的培养后才出现转分化，而通过 DNA 的大量复制也能激活占统治地位的特异产物的基因。

3. 去分化

去分化(dedifferentiation)是指细胞终末产物的减少或排除。虹膜细胞分化为晶状体细胞要排除它们的终末产物色素。排出的色素颗粒被进入损伤位点的巨噬细胞所吞噬。去色素亦与细胞增殖有关，细胞在去色素后就能增殖，并提高了对外部刺激因子的感受性。因此也可以认为从虹膜分化为晶状体是由去分化启动的。摘除晶状体可促进虹膜细胞的去分化，其表现为脱色素。

4. 细胞表面的变化

细胞表面特性的变化是转分化的诱因。在蝾螈活体内，摘除晶状体后再生晶状体的能力仅局限于虹膜背缘。而在体外培养条件下，背、腹部的虹膜均可。这是因为在活体内摘除晶状体后，虹膜背缘的细胞变得疏松，而腹部不变。在体外条件下，培养的细胞必须首先用酶解离，这可能改变了细胞表面的特性。如用强致癌剂亚硝基胍处理动物，则可在活体内诱发腹部虹膜再生晶状体。这可能是由于破坏了虹膜腹部细胞原有的组织结构。基于上述情况，细胞表面特性的变化可能为表达晶状体的潜能提供信号。

5. 激素

甲状腺和垂体分泌的激素均可刺激两栖类的角膜和虹膜再生晶状体。放射自显影的实验证明，当虹膜和垂体一起进行器官培养时，虹膜上皮细胞内掺入^3H－胸腺嘧啶核苷的量较没有垂体单独培养的多。这说明虹膜上皮在重新分化以前要求一定数量的细胞分裂，而垂体激素可以促进这个过程。当将垂体直接植入眼前房时，它能决定晶状体纤维细胞的发育方向，使之朝向垂体。

6. 培养条件

在体外条件下转分化的结果随培养液的不同而异。用 199、F－12 和 MEM 培养鸡胚的视网膜细胞时，MEM 可促使它转分化为晶状体，而另外两种就不能。高浓度不透析的胚胎血清可促进广泛的转分化，而低浓度和可透析的成体血清有抑制这个作用的倾向。据推测，胚胎血清可能和胚胎发育期间许多不同类型细胞的迅速分化有关，而在成体阶段的分化状态比较稳定。培养鸡胚视网膜和色素上皮细胞时，转分化的速度还与接种密度有关，高密度比低密度接种转分化为晶状体的速度快。

关于视网膜因子在转分化中的作用问题，意见尚不一致。因为在活体内神经视网膜对虹膜上皮细胞转分化为晶状体具有十分重要的作用。但在体外培养条件下，虹膜上皮细胞在没有神经视网膜时也能转分化为类晶状体。因此认为神经视网膜对于虹膜的转分化并不是诱导作用，而是起生长因子的作用。

第五节 角膜的发育

一旦晶状体板内陷，它就被来自相邻外胚层的两层细胞所覆盖。两栖类在增厚的预定晶状体板内层脱离后，外层预定角膜上皮细胞增殖也形成两层细胞的结构。现在发育中的视网膜和(或)

晶状体能起一种诱导者的作用。在这种诱导作用下，预定角膜上皮开始在内表面分泌细胞外基质，形成初级角膜基质，随后间质细胞侵入初级角膜基质中，形成次级角膜基质和角膜内皮（图12.18），最后变为透明的角膜。

两栖类角膜上皮和角膜内皮较长时期内一直保持分离状，被分别称为外角膜（outer cornea）和内角膜（inner cornea）。在内、外角膜间形成角膜基质后，间充质细胞迁入基质中，角膜开始变透明。直到蝌蚪变态期，在前肢出现前愈合为完整的角膜。

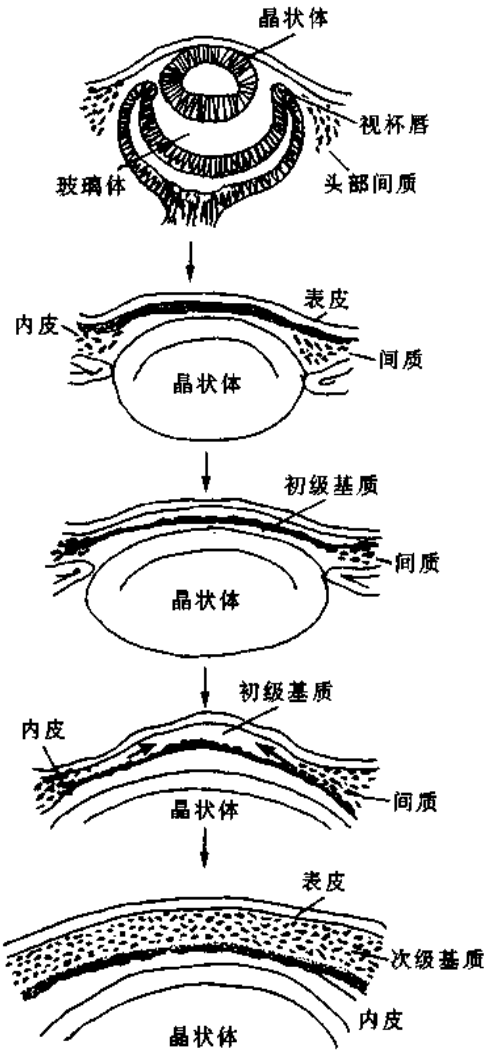


图12.18　角膜的发育（仿 Hay 和 Revel，1969）

在晶状体的诱导作用下，角膜上皮分化，并分泌含许多胶原层的初级基质。然后内皮细胞分泌透明质酸到基质中，使来源于神经嵴的间质细胞能进入此区。此后被间质或内皮分泌的胶原酶消化透明质酸，引起初级基质收缩

一、角膜诱导

在胚胎发育期间，覆盖于视杯和晶状体表面的外胚层受二者的诱导作用形成透明角膜的过程称为角膜诱导（cornea induction）。两栖类在变态前的蝌蚪期，内、外角膜分离，当除去外角膜后，移植同龄蝌蚪的躯体表皮到除去外角膜的眼球上，被移植的表皮片在视网膜和晶状体的诱导下经脱色素变为透明的角膜，亦称为角膜诱导。在林蛙切除外角膜及其周围的皮肤，由损伤的边缘再生出有色素的皮肤，覆盖于眼球上。在眼的影响下也会逐渐失去色素被诱导为角膜。两栖类在蝌蚪变态后就丧失了诱导表皮移植片分化为角膜的能力。

二、与角膜诱导相关的因素

1. 晶状体和（或）视网膜

在两栖类的研究中证明，眼球在角膜诱导中的重要性。如果分别切除神经胚期的眼原基或尾芽期的视泡，手术处的外胚层就发育为皮肤。从蝌蚪的外角膜下切除眼球，保留的角膜变为皮肤。把神经胚的眼原基移植到躯干的侧面或腹部的表皮下，受眼的诱导表皮转变为角膜。把蝌蚪的外角膜移植到身体的背部，以隔离眼对它的影响，角膜变为皮肤 。因此得出结论，眼与角膜之间存在着直接的诱导关系，但必须表皮和眼要有直接接触，并需要一定的时间。究竟眼球的哪一部分在角膜诱导中起主要作用？实验证明，视网膜和晶状体均可诱导角膜。在有尾两栖类，将幼虫的晶状体移植到躯体的皮肤下，覆盖于晶状体上的皮肤表皮中的色素消失，出现角膜诱导现象。在鸟类，晶状体单独就具有能力诱导早期角膜的形成。但是在最早期角膜上皮可能是受到视杯，而不是晶状体的第一个诱导的影响。另外，如果将5天鸡胚眼的晶状体摘除后，在此处嵌入一个间质细胞的移植块，手术后12天所有实验的角膜变为角质化的表皮。在体外器官培养的实验中得到同样的结果。这

种角膜和表皮在不同条件下相互转变的结果以及在爪蟾中摘除晶状体后由角膜再生出晶状体的例子，说明这种相互转变属于上皮细胞的组织变形。无尾两栖类在蝌蚪变态后就丧失了表皮转变为角膜的能力。而爪蟾在发育晚期也失去了角膜转变为晶状体的能力。无尾两栖类的移植实验证明，晶状体的存在与否对角膜诱导无明显影响。但从无尾两栖类的研究看来，好像是视网膜对角膜诱导影响更明显。用蟾蜍蝌蚪做实验证明，在断续的光照下角膜诱导速度加快，在不变的自然光照下速度较慢，在完全黑暗条件下不发生角膜诱导。结果表明视网膜感光细胞和角膜诱导之间有直接的关系。在切断视神经，使视网膜各层细胞退化，仅保留感光细胞的情况下，仍具角膜诱导能力，但速度较慢。当向蝌蚪腹腔内注射碘酸钠，选择性的使视网膜中的感光细胞中毒而破坏时，尽管视网膜其余各层都完整的保留下来，但视网膜却丧失了诱导角膜的能力。以上实验的结果表明，眼的视网膜，特别是其中的感光细胞的生理功能状态对角膜诱导有十分重要的作用。在光镜和电镜下也证明，角膜诱导与视网膜中感光细胞的形态分化有直接的关系。

2．细胞外基质

在体外培养条件下，鸡胚角膜上皮被诱导分泌初级基质是由于与晶状体囊的接触的刺激，其实质是与晶状体囊中所含的细胞外基质成分——胶原的直接接触刺激的影响，即使被杀死的晶状体囊也具有这种能力。积累在上皮表面的细胞外基质可帮助维持上皮细胞的进一步分化和刺激上皮产生胶原。这被称为"持续的诱导作用"。两栖类花背蟾蜍在预定角膜上皮与晶状体板接触后分离时，在二者之间出现原纤维丝。细胞化学和放射自显影的研究证明，它们是细胞外基质成分胶原和氨基多糖(glycosaminoglycans，GAGs)。这些细胞外基质成分在角膜分化前就出现，并在其正常分化发育中，表现出与角膜分化间的直接关系(图 12.19)。两栖类在移植的表皮透明时，也观察到在其内表面胶原纤维的增加。

3．类坏死和感受性

所谓类坏死(paranecrosis)是指细胞处于活的和死亡之间的，有着一整套原生质变化特征的临界状态，这种变化是可逆的。实验证明，经类坏死处理后的表皮移植片，角膜诱导的速度加快。但不同因子引起的类坏死，加快角膜诱导的速度是不同的。类坏死处理加快角膜诱导的原因是提高了表皮移植片的感受性。经生物化学和电镜研究分析表明，类坏死处理引起蛋白质、细胞核、细胞质和细胞外基质成分的一系列变化，这些变化可能与提高表皮的感受性和加快角膜诱导的进程有关。一些其他的物理或化学因子处理表皮移植片，也能影响角膜诱导的速度。其原因可能是这些处理改变了表皮的感受性，一些加快角膜诱导速度的措施可能与处理引起类坏死变化有关。

4．眼内压

眼内液体的压力对角膜正确的曲率的形成十分重要，这样光线才能被聚焦投射到视网膜上。如果将毛细玻璃管插入发育的鸡胚眼内，使眼内液体流失，角膜将不能发育出角膜所特有的曲率。

在角膜的正常发育和表皮移植片被诱导为角膜的过程中，放射自显影和组织化学的研究均发现，角膜上皮或表皮移植片内蛋白质和 RNA 的合成在角膜透明时出现高峰。这表明此时可能有与角膜分化相关的 DNA 的转录和 RNA 的翻译。但是，由于目前还未分离提取出对角膜严格特异的蛋白质，所以我们还不知道在角膜分化过程中哪些基因被转录以及它们合成了哪些蛋白质。尽管对角膜特异蛋白质的分析做了大量的工作，并研究一些角蛋白在体内和体外条件下的表达，但与晶状体分化的研究相比，还有大量更深入的工作要做。

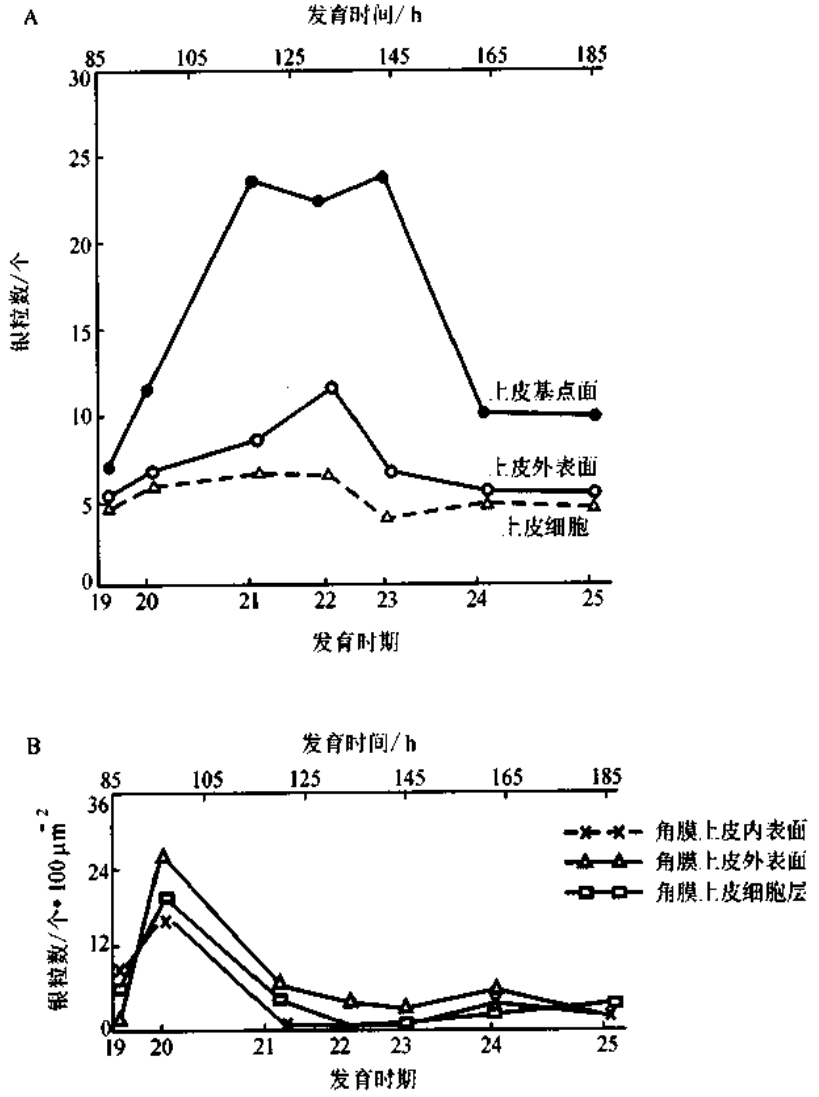


图 12.19 角膜上皮发育期间胶原和透明质酸合成的变化

A. ^{3}H 脯氨酸向角膜上皮的掺入(示胶原的合成) B. 角膜上皮在各发育时期透明质酸合成的变化,以 ^{3}H-氨基葡糖作标记。(A. 自冯伯森和仝允栩,1990; B. 自孙颖和仝允栩,1990)

参考文献

1 王子仁,仝允栩. 不同因子引起的类坏死对角膜诱导的影响. 两栖爬行动物学报,1984,3(2):33~39

2 王子仁,仝允栩. 花背蟾蜍蝌蚪变态期角膜发育的研究. 动物学报,1989,35:370~375

3 王子仁,仝允栩. 花背蟾蜍眼早期形态发生中其主要部分空间联系的研究. 动物学报 1990, 36:231~235

4 冯伯森,仝允栩. 花背蟾蜍角膜早期形态发生中胶原合成的放射自显影研究. 动物学报,1990,36:52~57

5 孙颖,仝允栩. 花背蟾蜍角膜早期形态发生中透明质酸的合成变化及其与角膜分化的关系. 兰州大学学报(自然科学版),1991,27:75~81

6 杨涛,仝允栩．花背蟾蜍角膜早期发育中氨基多糖的电镜细胞化学研究．实验生物学报，1989,22:393～405
7 杨增明,仝允栩．发生类坏死蝌蚪皮肤在诱导并分化为角膜过程中的超微结构．实验生物学报,1988,21:443～455
8 汪晓鹏,仝允栩．花背蟾蜍角膜早期发育中胶原合成、分泌和分布的研究．动物学报,1992,38:327～333
9 顾肃敏,仝允栩．花背蟾蜍角膜早期形态发生的超微结构研究．实验生物学报,1986,19:305～319
10 Beebe D C. Compart J T, Johnson M C, *et al*. The mechanism of cell elongation during lens fiber cell differentiation. Dev. Biol., 1982, 92:54～59
11 Coulombre J L, Coulombre A J. Lens development: Fiber elongation and orientation. Science, 1963, 142:1489～1490
12 de Pomerai D I, *et al*. Expression of toxin receptors on cell surfaces in transdifferentiating cultures of neural retina. Dev. Growth & Differ., 1984,26:111～119
13 Freeman G. Lens regeneration from the cornea in *Xenopus laevis*. J. Exp. Zool., 1963,154:39～65
14 Hay E D. Development of the vertebrate cornea. Int. Rev. ytol., 1980, 63:263～322
15 Hendrix R W, Zwaan J. Changes in the glycoprotein concentration of the extracellular matrix between lens and optic vesicle associated with early lens differentiation. Differentiation, 1981, 2:357～362
16 Henry J J, Grainger R M. Inductive interactions in the spatial and temporal restriction of lens－forming potential in embryonic ectoderm. Dev. Biol. 1987, 124:200～214
17 Henry J J, Grainger R M. Early tissue interactions leading to embryonic lens formation in *Xenopus laevis*. Dev. Biol., 1990, 141:149～163
18 Lopashov G V, Stroeva O G. Morphogenesis of the vertebrate eye. Adv. Morphog., 1961, 1:331～370
19 McAvoy J W. Cell division, elongation and the co－ordination of crystallin gene expression during lens morphogenesis in the rat. Ibid., 1978, 45:271～287
20 Okada T S. Recent progress in studies of the transdifferentiation of eye tissue in vitro (review). Cell Differentiation, 1983, 13:177～183
21 Saha M S, Spann C L, Grainger R M. Embryonic lens induction: more than meets the optic vesicle. Cell Diff. Dev., 1989, 28:153～172
22 Shi P, Wang Z R, Deng Y W. Expression of specific protein in the corneal epithelium during morphogenesis of the mouse eye. Folia zool., 2000,49(2):93～100
23 Yamada T, McDevitt D S. Conversion of iris epithelial celss as a model of differentiation control. Differentiation, 1984, 27:1～12

第十三章　变态——激素调节发育和细胞分化

在动物的发育中，一些分子能经过长距离的移动从一种细胞类型到另一种细胞类型，并调节动物的发育。这些可扩散的发育调节因子能通过血液移动引起其他组织的分化和形态发生，它们被称为激素(hormone)。因为极微量的激素就足以完成它的功能。但要从组织中分离却是极其困难的。所以，激素控制发育引起细胞分化的研究分析主要集中于发育明显的"重新编排"中，这就是变态(metamorphosis)。

在多种动物中，胚胎发育经历一个幼虫期(larval stage)，幼虫具有与成体非常不同的特点，在发育中其形态和构造经历明显的阶段性变化，其中有一些器官退化消失，有些得到改造，有些新生出来，从而结束幼虫期，建成成体的结构。这种现象统称为变态。变态中幼虫特有的构造形式常常是与某种功能相联系的。如海胆的长腕幼虫能在海洋中随洋流移动，而成年的海胆营固着的生活方式。蝴蝶和蛾的幼虫是为摄食而特化的，具有口器，而它们的成虫是为飞翔和繁殖而特化的，成虫通常缺少口器。通过变态，不仅成体的形态结构得以建立，同时其生理特性、行为、活动方式和生态表现与幼虫期有明显的不同。

在变态期间，发育过程被特异的激素重新激活，整个有机体发生巨大变化，为自己准备新的生活方式。这些变化不仅是形态结构的变化，而且在生化分子水平发生明显的变化。在两栖类的蝌蚪变态时，引起肝内的酶、血红蛋白和眼睛色素发育上的成熟，同时也重新改造神经、消化和生殖系统。因此变态是影响到整个有机体发育上明显变化的时期。

现以最具代表性和具有典型性的是昆虫和两栖类的变态，以及小鼠乳腺的发育，以此作为主要内容介绍激素如何重新激活在出生后发育的过程及其相关的机制。

第一节　昆虫的变态

变态是昆虫类的一个重要生物学特点，不仅这类动物的胚后发育、生长和性成熟都完成于变态期，而且其历史发展过程亦由变态的各个环节反映出来。不少种类昆虫的变态期占有其生命周期的绝大部分时间。

一、昆虫变态的模式

昆虫的变态有多种形式，主要有以下三种模式：

1. 原变态

少数低等的昆虫种类，如衣鱼，跳虫和双尾虫等的幼体虽经历多次蜕皮(molt)，但不具明显的幼虫期而是直接发育 。这种变态称为原变态(prometamorphosis)，也可将它归于简单变态(sim-

ple metamorphosis)。

2. 半变态

半变态(hemimetamorphosis)是一种不经过蛹期(pupal stage)的变态形式，故又称为简单变态或不完全变态(incomplete metamorphosis)。这种变态模式的特点是幼虫经过一至数次蜕皮后直接化为成虫。许多直翅类和半翅类的昆虫，如蝗虫和臭虫等属于半变态的模式。它们经历一种渐进的变态，成虫的器官基本上是随着每次蜕皮逐渐长大而成，不但各期幼虫之间很少有形态上的差别，甚至在末期幼虫和成虫之间亦无重大差别(图 13.1A)。在变态过程中成体器官的形成无任何明显的不连续性。翅、生殖器官和其他成体构造的原基在孵化时就已存在，它们随着每次蜕皮变得更成熟。在最后一次蜕皮后形成具翅的和性成熟的昆虫成体。半变态昆虫的幼虫形式统称为若虫 (nymph)。蜉蝣和蜻蜓等的若虫皆为水生，以鳃为呼吸器官，故特称为稚虫(naiad)。当稚虫羽化(eclosion)时，有些幼虫的器官退化消失，有的被保留下来。大多数半变态昆虫的末期幼虫的翅芽不具任何功能，惟独蜉蝣类动物的该期幼虫的翅具飞翔的功能，因而称这种末期幼虫为亚成虫(subimago)。

3. 全变态

在双翅类、鞘翅类和鳞翅类昆虫，如蝇、甲虫、蛾和蝴蝶中，其发育在幼虫和成虫期之间有一个明显突然转变的蛹期，称为全变态(holometamorphosis；图 13.1B)。新生的幼虫(蛆、蛴螬和毛虫)随着它们的长大经历一系列的蜕皮。新孵出的昆虫幼虫被一个硬的角皮(cuticle)覆盖着。为了长大，它们必须产生一个新的较大的角皮，并蜕去旧的。因此，这些昆虫的胚后发育是由连续的蜕皮组成的。尽管在变为成虫前蜕皮的次数是因种而异的，但环境的因素会增加或减少蜕皮的次数。蜕皮之间的时期称为龄虫(instars)。最后一期龄虫称为蛹前龄虫。在此之前，幼虫以生长作为主要特征。蛹前龄虫经过一次变态蜕皮(metamorphic molt)，变成蛹(pupa)。此过程称为蛹化(pupation)。蛹并不摄食，它们依靠幼虫消化的食物作为能量来源。在蛹的角皮中发生从幼虫到成虫的转变。此时幼虫旧身体的大部分被系统地破坏，随之新成虫的器官由未分化的细胞群，成虫盘(imaginal discs)发育产生(图 13.2)。这是一个名副其实的脱胎换骨的时期。在经过这些剧烈的变化后发育为成虫，它经历最后一次蜕皮，成虫蜕皮(imaginal molt)产生一个成熟的昆虫。此过程称羽化(eclosion)。蛹化和羽化是全变态过程中两次最重要的蜕皮。

在果蝇(*Drosophila*)中具有 10 对主要的，重建整个成体(除腹部)的成虫盘和 1 个形成生殖结构的生殖盘(genital disc，图 13.2)。腹部表皮是由一小组位于幼虫肠的区域，称为成组织细胞(histoblasts)的成虫细胞和其他一些成组织细胞团形成的，后者位于整个幼虫中，它们将来形成成虫的内脏器官。成虫盘在新孵化的幼虫中可以清楚地看到，呈局部增厚的表皮状。果蝇新孵化的眼、触角、翅、平衡棒(haltere)、腿和生殖盘分别含有 70、38、20、36～45 和 64 个细胞。虽然大多数幼虫细胞只具有限的有丝分裂能力，但成虫盘细胞在特定的时间能迅速地分裂。随着细胞的增殖，它们形成一管状表皮，本身折叠成一个致密的螺旋。最大的翅盘后来含有大约 60 000 个细胞，而腿和触角盘含有大约 10 000 个细胞。在变态时这些细胞分化并伸长。腿盘的命运图谱和伸长过程如图 13.3。位于腿盘中央的细胞伸出变为腿最远端的部分——爪和跗节(tarsus)，而外侧的细胞变为近端的结构——基节(coxa)和连接表皮(adjoining epidermis)。在分化后，附肢和表皮的细胞分泌适于特定区域的角皮。虽然腿盘起初是由表皮细胞组成，但在发育初期少数添加上皮细胞(adepithelial cell)迁移到盘中。在蛹期这些细胞产生为服务于这个结构的肌肉和神经。已知成虫盘的伸长

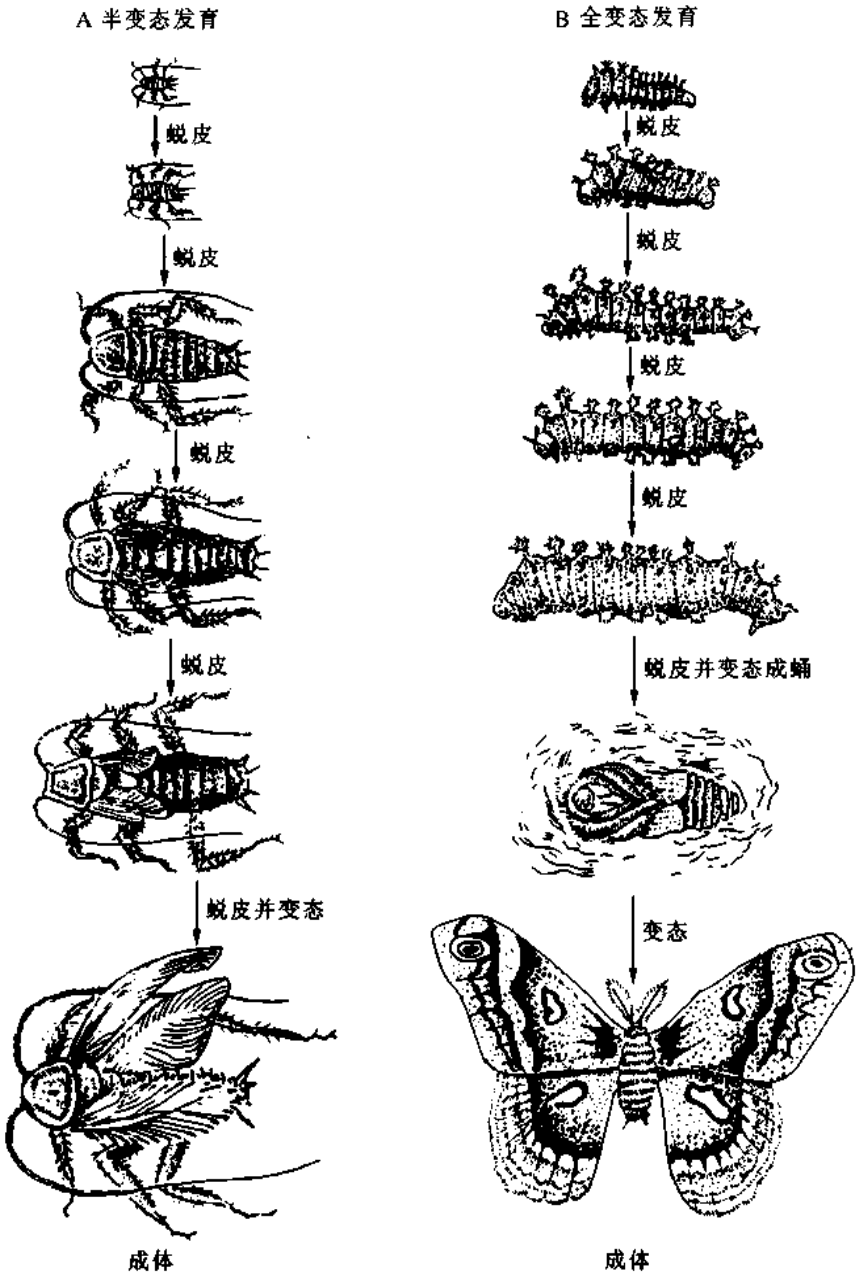


图 13.1　半变态和全变态

是依赖激素调节的，当将成虫盘培养于含蜕皮激素和 20－羟基蜕皮激素(20－hydroxyecdysone)的培养基中时，能起始伸长过程。

二、组织分解和系统重建

在昆虫变态中，组织分解(histolysis)是一个非常重要的组织学内容。即使在每次蜕皮时其前后变化不大，但总不可避免地出现表皮的破坏和修补，这时一部分无用细胞死亡分解，另一部分新细胞生成并进行分裂。此属一种组织学变化，在本质上，它既不是组织分化，也不能看作返幼

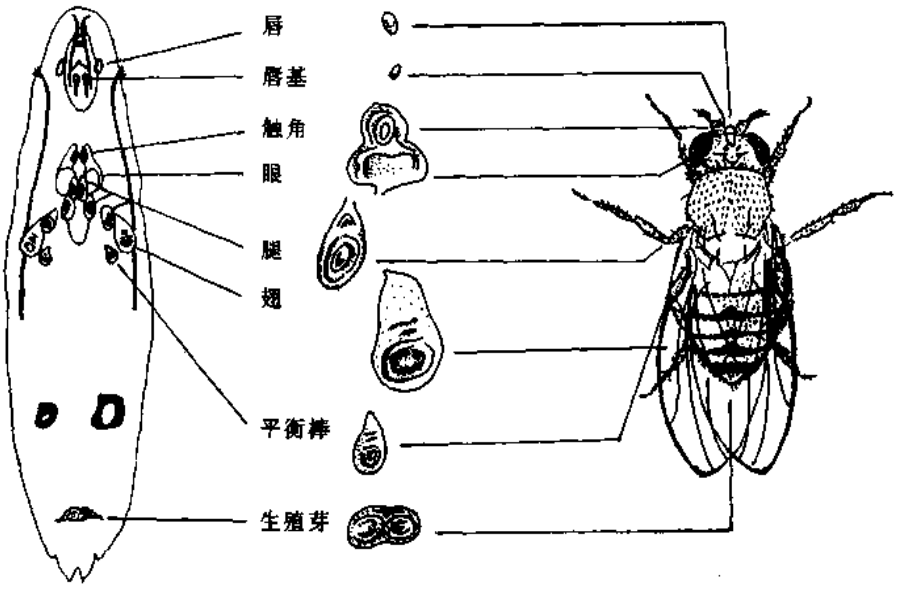


图 13.2 果蝇(*Drosophila melanogaster*)成虫盘的位置和发育命运

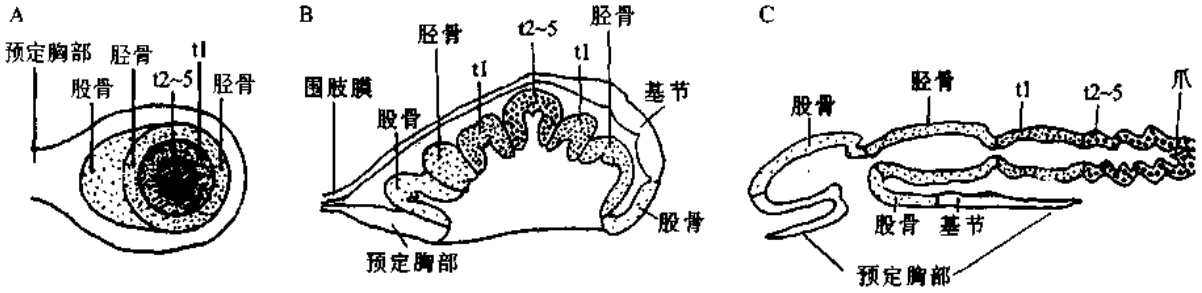


图 13.3 果蝇腿盘的伸长顺序

A. 未外翻腿盘的表面观 B. 过伸长和完全外翻腿盘的纵切面 C. 成体的腿

t1. 基跗节 t2~5. 跗节 2~5

现象(rejuvenation),只不过是一种组织分解和组织生成(histogenesis)。昆虫的组织分化通常可分为三种情况:一是破坏性变化,退化器官的组成细胞先出现体积膨大,而后逐渐溃解消散。二是纯建设性变化,如成虫盘组成细胞的分裂和生长,这些细胞总是参加成虫器官的形成。三是居间性变化,此时既有破坏性变化又有建设性变化。

在昆虫变态中,组织分解的明显例子是神经系统的重建。在一种蛾(*Manduca*)的幼虫中,支配前腿肌肉的神经是单独对蜕皮激素敏感的,并随幼虫靶组织的死亡同时消失。然而,支配幼虫第二斜肌(oblique muscle)上的运动神经元,在靶组织死亡时却存活下来,并支配新形成成虫的第四背外侧肌,这个肌肉是在变态期间分化的。另一个例子是萤火虫的发光器及其支配神经的变化。萤火虫幼虫腹部第 8(最后的)体节具有成对的发光器,来自腹部第 8 体节的神经控制它们的亮度。而在蛹形成期间,腹部第 6 和 7 体节也发育出产生亮光的光细胞和控制发光时间的神经。到蛹形成末期,只保留有第 6 和 7 体节为有功能的发光器。另外,如果幼虫的发光器被除去,成虫的发光器仍将形成,这表明幼虫的某种功能能被成虫的不同区域所接替。

昆虫变态中组织分解的机制，因在不同种的昆虫和不同器官中表现出极大差别，因而说法不一。一种意见认为，血细胞对组织分解具有重要作用，如在蝇类发现血细胞中有溃散组织的颗粒和血细胞具有消化肌肉碎屑的能力。另一种意见认为，巨噬细胞起重要作用，如膜翅目昆虫中，发现巨噬细胞吞食幼虫的唾液腺、脂肪、丝腺和肌肉等组织细胞的现象。

三、昆虫变态的激素调控

昆虫变态的激素控制由 Wigglesworth(1934)的著名实验所证实。Wigglesworth 研究一种吸血蝽(*Rhodnius prolixus*)，它在经历明显的变态前有 5 个龄期。在实验中将一个吸血蝽 1 龄幼虫的头部切除后，将其颈部与一个蜕皮的 5 龄幼虫的头部相连时，小的 1 龄幼虫发育出成虫的角皮、身体结构和生殖器(图 13.4,A)。这表明血液提供的激素负责变态的诱导作用。

Wigglesworth 也证明，靠近昆虫脑的咽侧体(corpora allata)产生一种激素，它抑制进行变态的倾向。如果从一个 3 龄幼虫中除去咽侧体，下一次蜕皮幼虫将变为一个早熟的成虫。相反，如果将从 4 龄幼虫中取下的咽侧体植入到另一个 5 龄幼虫中，这种幼虫将蜕皮成为特别大的"6 龄"幼虫，而不是变为成虫(图 13.4,B~D)。

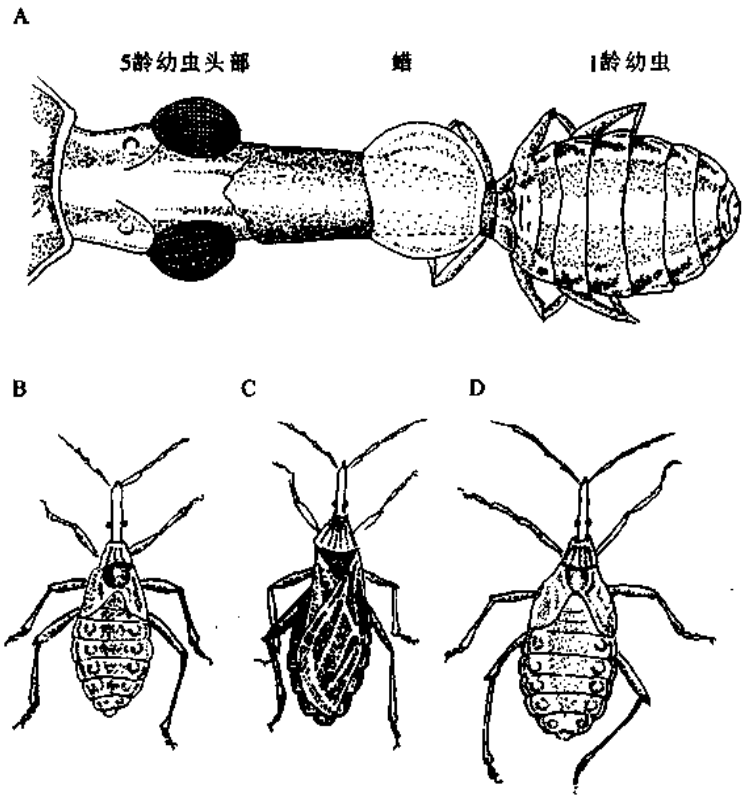


图 13.4　昆虫变态激素控制的证明

A. 一个吸血蝽的 1 龄幼虫连接于一个蜕皮的 5 龄幼虫的头部产生一个早熟的成虫的技术　B. 正常的吸血蝽 5 龄幼虫　C. 正常的吸血蝽成虫　D. 从一个 4 龄幼虫中取下的咽侧体植入一个蜕皮的 5 龄幼虫中所产生的"6 龄幼虫"

1. 与昆虫变态有关的激素及其作用

与昆虫变态直接相关的激素主要有两大类：一类是由前胸腺(prothoracic gland 或 ecdysial gland)分泌的蜕皮激素(ecdysone 或 molting hormone)，它负责幼虫新壳的泌成和硬化、蛹化、蛹壳形成以及与蜕皮相关的生长和分化等。另一类是由咽侧体(corpus allatum)分泌的保幼激素(juvenile hormone)，它主要抑制上述蜕皮激素负责的各种活动，协调控制蜕皮的特征发育。虽然激素控制昆虫变态的详细机制在种间是不同的，但激素作用的一般模式通常是非常相似的(图 13.5)。昆虫的变态是由脑神经分泌的肽激素所控制的，并由上述两类效应器激素调节的。

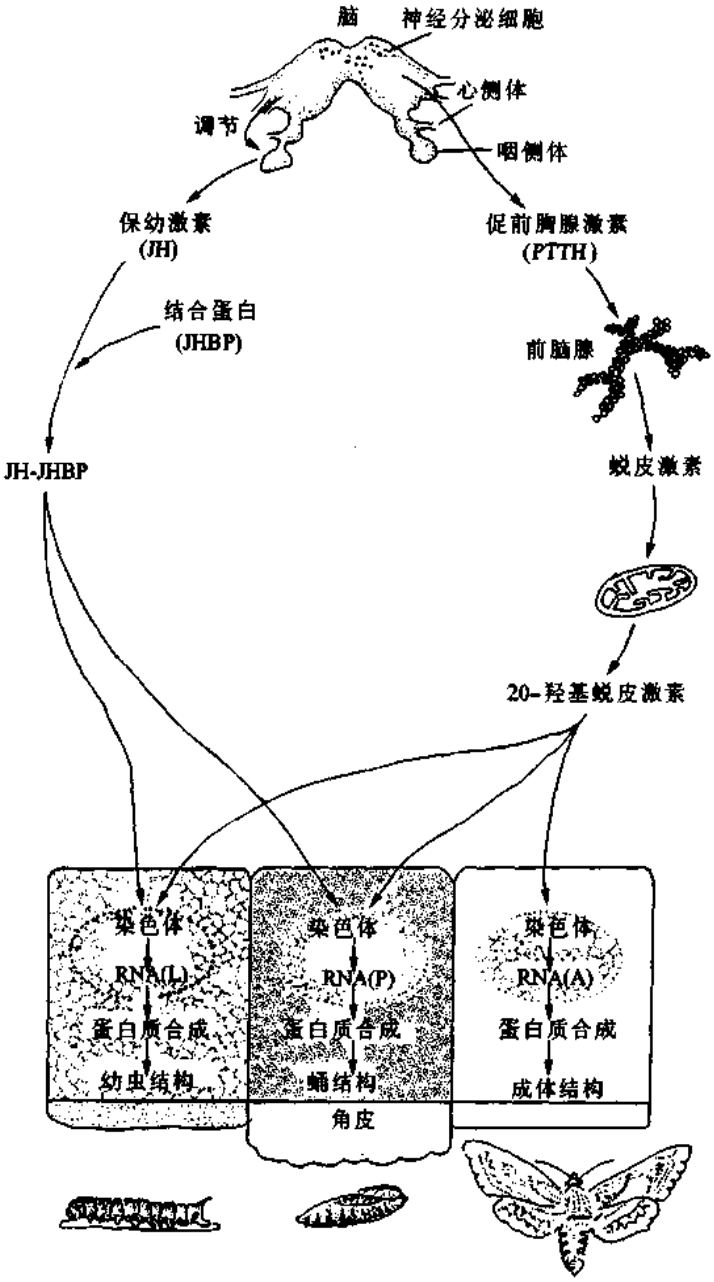


图 13.5 烟草天蛾蜕皮和变态的控制

蜕皮过程是在脑中起始的，脑中的神经分泌细胞对神经的、激素的和环境的因子起反应中释放促前胸腺激素(prothoracicotropic hormone，PTTH 或 thoratropic hormone)。PTTH 是一类相对分子质量约 40 000 的肽激素，它刺激由前胸腺产生蜕皮激素(ecdyson)。但蜕皮激素并不是一种活性激素，它只是一种激素原(prohormone)，必须转变为一种活性形式才具有活性功能。这种转变是在如脂肪体那样周围组织的线粒体或微体中，由含血红素(亚铁原卟啉)的氧化酶完成的。在此过程中，蜕皮激素被转变为有活性的 20－羟基蜕皮激素(图 13.6)，过去亦称为 β－蜕皮激素、蜕皮固醇酮、壳层蜕皮素等。每次蜕皮是由一次或多次 20－羟基蜕皮激素的波动引起的。对一个幼虫的一次蜕皮来说，第一次波动是在幼虫的血淋巴(血)中产生 20－羟基蜕皮激素的小的升高，并诱发细胞定型(commitment)的变化。第二个大的 20－羟基蜕皮激素的波动引起一些与蜕皮相联系的分化事件。由这些波动产生的 20－羟基蜕皮激素决定和刺激表皮细胞合成一些消化和重新利用角皮成分的酶。在某些情况下，环境条件能控制蜕皮过程。如天蚕蛾(*Hyalophora cecropia*)在蛹形成以后 PTTH 的分泌停止。蛹在整个冬季保持这种暂停状态，称为滞育(diapause)。如果不暴露于冷的天气，滞育将无限期延长。然而，一旦在冷的环境中暴露两周，当再转回到温暖的环境时，蛹便开始蜕皮。

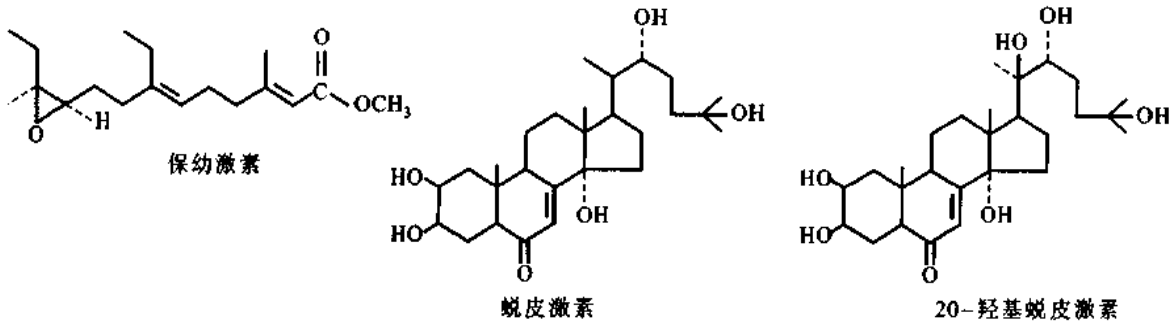


图 13.6　保幼激素、蜕皮激素和有活性的蜕皮激素(20－羟基蜕皮激素)的结构

在昆虫变态中，第二个主要的效应器激素是保幼激素。在蝶和蛾的幼虫中，一种有活性的普通保幼激素的结构示如图 13.6。保幼激素是由咽侧体分泌的。咽侧体的分泌细胞在幼虫蜕皮时是有活性的，但在变态蜕皮期间是无活性的。这种激素可防止变态。只要保幼激素存在，20－羟基蜕皮激素激起的蜕皮导致一个新的幼虫龄期。在最后一次龄期，从脑到咽侧体的中间神经元抑制咽侧体产生保幼激素，同时体内对已存在的保幼激素的降解能力增加。这两种机制引起保幼激素的水平下降到一关键的阈值以下。这又激发从脑中释放 PTTH。反过来，PTTH 刺激前胸腺分泌小量的蜕皮激素，在相对缺少保幼激素的情况下，产生的 20－羟基蜕皮激素决定细胞向蛹的发育。在随后发生的蜕皮使幼虫转变到蛹。在蛹形成期间，咽侧体并不释放任何保幼激素，而 20－羟基蜕皮激素刺激产生的蛹最后变为成虫。如果从幼虫中除去咽侧体，将使幼虫提前变态为较小的蛹或小的成虫(图 13.7)。而注入外源的保幼激素到最后龄期的幼虫中，能诱发出一次额外的幼虫蜕皮，从而延缓幼虫的蜕皮。因此只有在缺少保幼激素并接受 20－羟基蜕皮激素的情况下，幼虫才能变态为成虫。其分子基础包含新基因产物的转录。实验证明，在缺少保幼激素的情况下，20－羟基蜕皮激素诱导从晚期的胀泡产生的蛋白质的合成。在起初的 20－羟基蜕皮激素波动期间，当

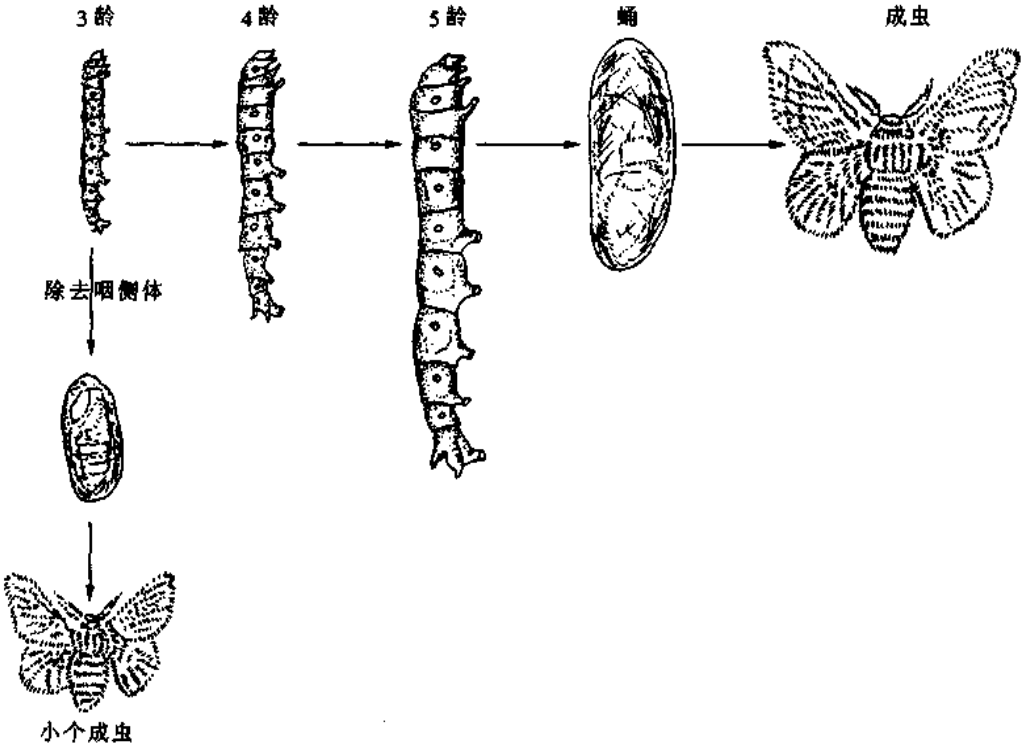


图 13.7 在 3 龄阶段除去咽侧体引起天蚕蛾的提前变态，而不继续蜕皮经过 5 龄阶段，幼虫直接开始蛹化

保幼激素存在时早期的胀泡像通常那样产生，但晚期的胀泡被抑制。

2. 昆虫变态基因表达的调节

昆虫的变态变化是个体发育中基因型变化的结果，是一系列基因表达的过程。这在双翅类昆虫的多线染色体(polytene chromosome)结构的变化上，被清楚地表现出来。已对蜕皮激素活动的机制进行了极好的研究。在正常发育期间，果蝇的多线染色体中一些特异的带变得膨大，称为胀泡(puff)。这些胀泡显示发育阶段的特殊顺序模式特点(图 13.8)。大量的研究已经证明，有许多专一性基因转录活动在胀泡处进行，因此，胀泡本身就是基因转录位点，它是基因转录的一种形态学表现。

在正常发育中看到的胀泡相同模式，也在通常蜕皮的时间以前用蜕皮激素处理幼虫，或在体外条件下用蜕皮激素处理幼虫的唾液腺时发生。如将蜕皮激素注入摇蚊(*Chironomus tentans*) 4 龄幼虫体内，结果先有一个新胀泡的生成和一个老胀泡的缩退，直到处理 72 小时为止，又有几个新胀泡相隔不同时间先后生出。这些新生胀泡的顺序与正常发育情况下幼虫或蛹期将蜕皮时出现的胀泡的顺序极相似，因而证实这些胀泡为蜕皮特异的基因转录位点。另一个具代表性的实验是将摇蚊中期龄虫置于低浓度的蜕皮激素中处理时，多线染色体上原有的胀泡都发生缩退而不能继续发育。但一旦将浓度适当提高，胀泡的生成立即活跃，这说明蜕皮激素的浓度至关重要。用交联羟基蜕皮激素到染色质的免疫荧光技术已证明，几乎所有的对羟基蜕皮激素敏感的胀泡位点结合羟基蜕皮激素(图 13.9)。

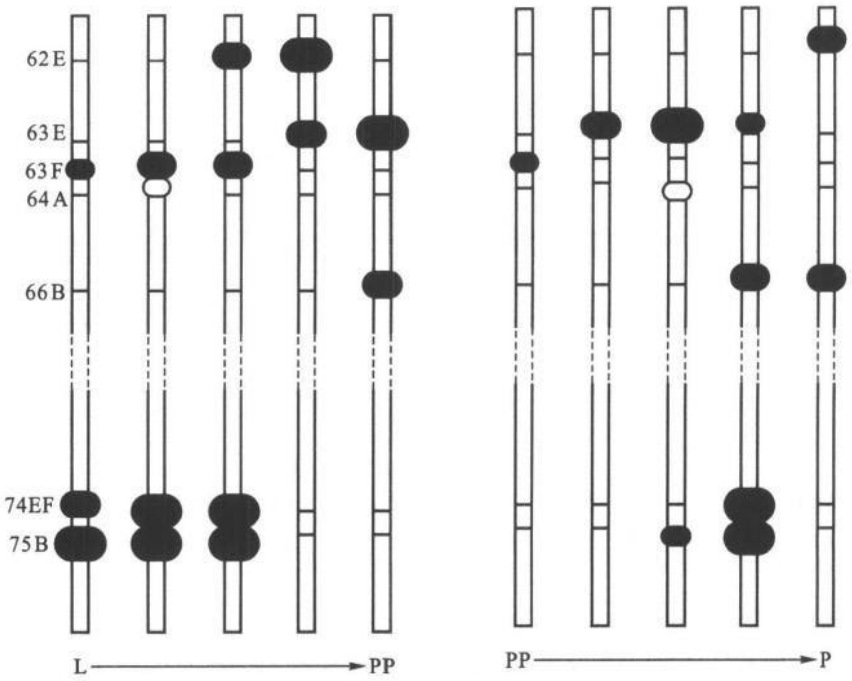


图 13.8　果蝇(*Drosophila melanogaster*)染色体 3 一条臂的图解(自 Ashburner,1967)
示在幼虫－预蛹期蜕皮前(L→PP)和在预蛹期－蛹期蜕皮前(PP→P)前七个胀泡的出现和退化的顺序

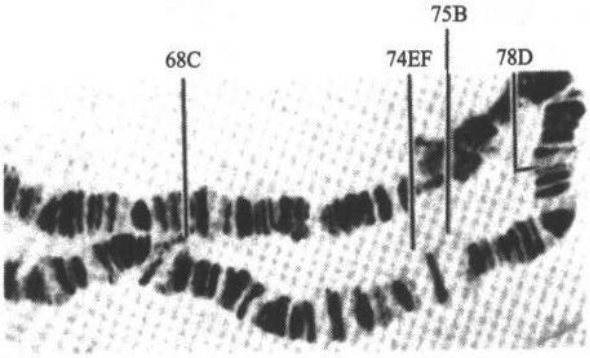


图 13.9　在果蝇多线染色体上蜕皮激素的定位
一段多线染色体的相差显微镜照片

根据晚期龄虫的组织对 20－羟基蜕皮激素的反应可大体分为两种类型:专性幼虫组织,在对 20－羟基蜕皮激素的反应中退化;成虫盘组织与 20－羟基蜕皮激素反应产生成体的结构。现在还不知道为什么当给予相同的信号时,一组细胞增殖,而另一组细胞退化。但最近的研究提示,在每种组织中并非所有的蜕皮激素受体都是相同的。蜕皮激素受体(ecdysone receptor,EcR)的基因能被选择地拼接成三种 mRNA,将产生三种不同的,但是相关的蛋白质,EcR－A、EcR－B1 和 EcR－B2(图 13.10)。所有的细胞好像具有一些这样的蛋白质,但是专性幼虫组织和退化的神经元中与 EcR－A 相比含有大量的 EcR－B1。反过来,在成虫盘和正分化的神经元中含有的 EcR－A 比

EcR－B1 多，因此有可能在不同的受体与 20－羟基蜕皮激素结合时，它们激活了一些基因的不同位点。

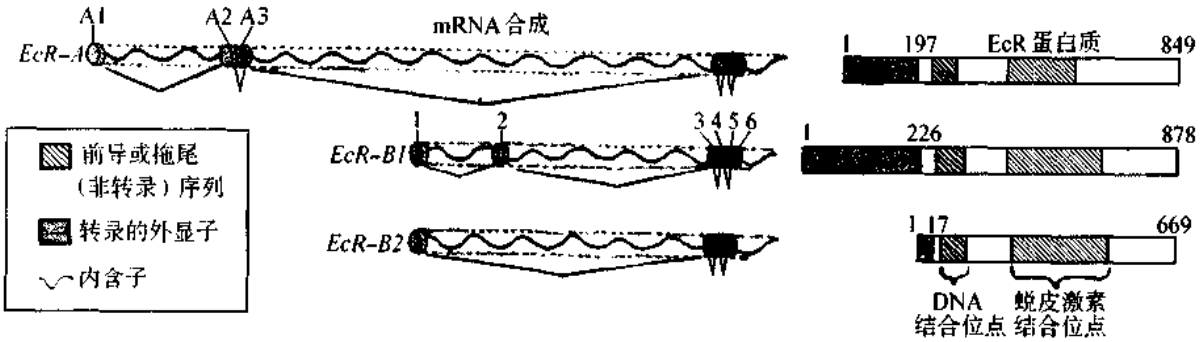


图 13.10 蜕皮激素受体的形成（引自 Talbot 等，1993）

蜕皮激素受体（EcR）转录本可选择 mRNA 的拼接产生三种类型的 mRNAs，产生的蛋白质具有相同的 DNA 结合位点和 20－羟基蜕皮激素结合位点，但具有非常不同的氨基酸末端

除组织间对 20－羟基蜕皮激素反应的异质性（heterogeneity）外，在单个细胞中也存在对 20－羟基蜕皮激素反应的异质性。发生在三期龄虫晚期的对 20－羟基蜕皮激素敏感的胀泡可大致分为三类：20－羟基蜕皮激素引起退化的胀泡、它迅速诱导的胀泡和在刺激后几小时才出现的胀泡。如在幼虫的唾液腺中，约有 6 个胀泡在 20－羟基蜕皮激素处理后几分钟就出现，这些基因不需要蛋白质合成激活。而在发育晚期被诱导的很大的一组基因确实需要蛋白质的合成，以便它们变为转录的。因此，“早期”基因形成的蛋白质产物对“晚期”基因的激活是必须的。另外，这种蛋白质本身也将引起早期基因转录的关闭。Ashburner 提出一种 20－羟基蜕皮激素调节转录的模型，认为首先 20－羟基蜕皮激素与其受体结合，这种复合物可以结合于早期的胀泡基因和晚期的胀泡基因，但只激活早期的胀泡基因。早期基因的蛋白质产物将抑制自身基因的转录和可能通过置换蜕皮激素受体激活晚期的胀泡基因（图 13.11）。

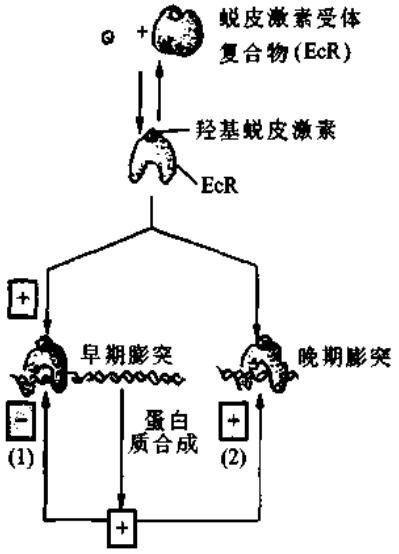


图 13.11 20－羟基蜕皮激素调节转录的模型（引自 Richards，1992）

最近的研究支持这一模型，并提出早期基因代表转录因子能调节蜕皮激素的作用。蜕皮激素受体是一个转录因子，它结合这种激素并把它带到 DNA 的特定区域，形成一个杂二聚体（heterodimer）。在与 *ultraspiracle*（*USP*）基因产物形成杂二聚体之前，EcR 既不与它的激素结合，也不与它的 DNA 序列结合。在 EcR/USP 杂二聚体已形成后，与 20－羟基蜕皮激素结合，并激活最早的对蜕皮激素敏感的基因。已发现这些早期的胀泡编码一组转录因子，可能也与蜕皮激素受体形成杂二聚体。一个早期的蜕皮激素敏感基因，*E75* 编码三种类固醇受体蛋白，这些不同的形式是由可选择的 RNA 拼接产生的。早期到晚期的一个基因，*E78*

是由一种 E75 蛋白激活的，它编码另一种类固醇受体。值得注意的是，20－羟基蜕皮激素不仅刺激某些区域胀泡的形成，而且也引起某些已存在的胀泡的退化。后一类胀泡中的一个位于染色体 3 左臂上的 68C 位置，这个胀泡位点含有 Sgs3 的基因，Sgs3 是一种"胶蛋白"，负责将蛹的外壳粘连到一种固体的表面。只有在唾液腺中染色体的这个区域在最后的龄虫中形成胀泡。当将 20－羟基蜕皮激素加入培养的唾液腺中，引起这个胀泡的迅速退化，并终止这个基因的转录。因此，这种胶是在需要它将幼虫粘连到一种基质时被合成，而在此后变态发生时此基因被关闭。

蜕皮激素直接刺激转录的假说得到以下发现的支持，标记的蜕皮激素聚集在靶细胞的核中。由蜕皮激素诱导的早期的胀泡在没有蛋白质合成的情况下可形成，但晚期的胀泡不能，而且认为它们的形成要求早期胀泡的产物。

实验证明，保幼激素对胀泡的形成也具有一定的影响，但在不同动物中表现并不一致。如摇蚊的蛹前龄虫用保幼激素处理时，不会有额外龄期的出现。但当用人工合成的保幼激素的类似物 JHAs 处理时，即有龄虫－蛹的中间形态出现，有些本应在此期变大的胀泡变得萎缩或不再膨大。对果蝇来说，不论是用保幼激素还是用其类似物 JHAs 处理，都对胀泡的形成起抑制作用。如果用 30 μmol/L 的保幼激素或 3 μmol/L 的 JHAs 处理，即使是由蜕皮激素诱导而生的胀泡也会受到抑制。至于保幼激素何以不能作用于摇蚊而能作用于果蝇，其原因尚不清楚。到目前为止，保幼激素使基因活化或去活化(指使胀泡生成或受抑制)的机制也只能作些推断。有人曾提出，在某一遗传位点由蜕皮激素引起的相互作用，可因保幼激素的拮抗作用而停止。此后有人又提出，无论是蜕皮激素或是保幼激素，它们在诱导出小数目和不定点的胀泡的同时，都又抑制了另一些胀泡位点的活动，这说明在上述激素的作用下产生一种活化(activation)和去活化(deactivation)同时存在的模式。其后在果蝇的研究中也肯定了这种模式的存在。

3. 环境对昆虫变态的影响

在某些昆虫中，幼虫的大小在起始变态中起一种重要的作用。烟草天蛾的幼虫直到其体重达 3 g 才开始变态，而在一些情况下，它需要一次额外的蜕皮以达到这一体重。显然，直到幼虫达到这一体重，脑才释放一种抑制保幼激素释放的物质。在蜜蜂中，雌性幼虫在其蛹期蜕皮时的大小，决定此个体是变为一个工蜂，还是一个蜂后。一个喂以富含营养王浆的幼虫，在其最后的龄期保持咽侧体的活性。而咽侧体分泌的保幼激素推迟了蛹化作用。因此，产生的蜂具有较大的个体，在某些种中其解剖学结构也发生进一步的特化。

一些植物成分也会引起变态的紊乱。如红蝽(*Pyrrhocoris apterus*)的幼虫用欧洲生产的纸饲养时，能正常变态；而在美国用当地生产的纸饲养时，幼虫在 5 龄期结束时不能进行变态，相反，变成较大的 6 龄期的幼虫，最后，在变成成虫前全部死亡。经研究确定，美国纸的来源是产于美国北部和加拿大的一种胶冷杉，这种树合成一种物质，其成分非常类似保幼激素，它利用这种物质得以摆脱某些昆虫的采食。另外一些植物含有的化学成分可产生同样的效应，引起取食者的死亡。但它是通过引起过早地变态达到这个目的。已从菊科植物中分离出两种成分，发现它们能引起某些昆虫幼虫早熟地变态为不育的成虫。这些成分称为早熟素(precocenes)，它们的化学结构式如图 13.12A。当一些昆虫的幼虫或若虫用这些成分的任一种处理时，将再经过一次蜕皮，然后变态为成虫的形态(图 13.12B)。早熟素通过在未成熟的昆虫中引起咽侧体细胞选择的死亡完成这个过程。这些细胞是负责合成保幼激素的，因为没有保幼激素，幼虫开始变态和进行成虫的蜕皮。另外，保幼激素也负责卵的成熟，没有这种激素雌性是不育的。因此，可利用早熟素引起某些昆虫

幼虫早熟变态为不育的成虫，从而达到消灭害虫，保护植物的作用。

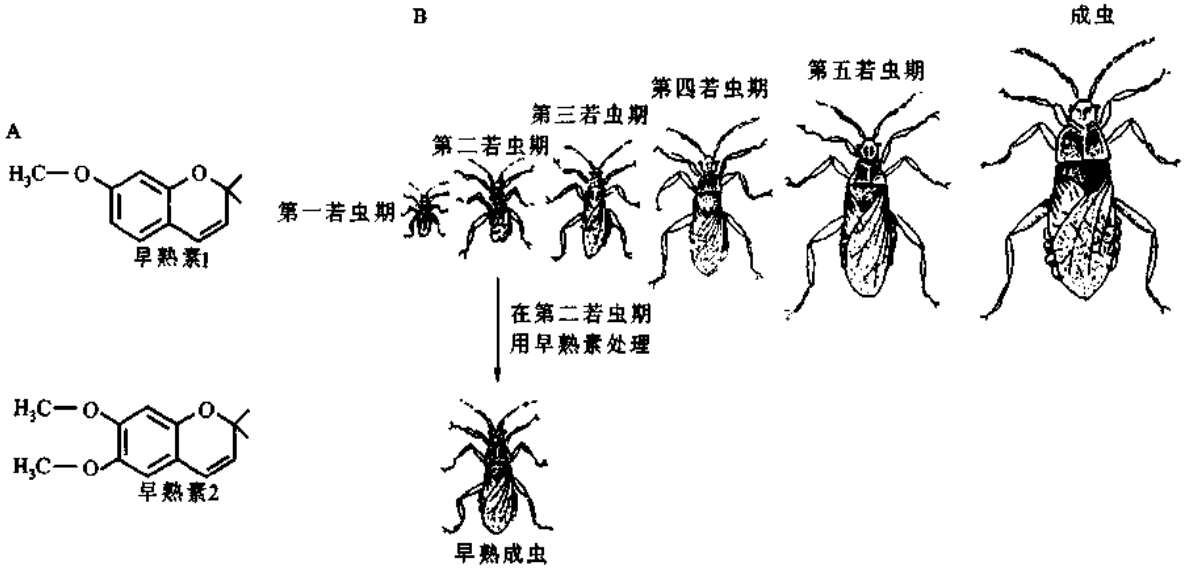


图 13.12 由早熟素引起 *Dysdercus* 早熟变态

A. 在植物中发现的两种有活性的早熟素 B. *Dysdercus* 停止发育。当在发育的第二龄期用早熟素处理，它们变态为不育的早熟成体，而不能继续正常蜕皮的发育顺序

第二节 两栖类的变态

两栖类在系统发生中是作为脊椎动物从水生到陆栖过渡的联系类型，因此两栖类的变态通常是与那些使水生的幼虫准备成为陆栖生活成体的变化相联系的。这些变化不仅是外部形态的变化，而且包括内部重新改建神经系统、消化系统和生殖系统等，同时也引起肝脏的酶、血红蛋白和视网膜色素发育的成熟。

一、两栖类的变态现象

两栖类的变态因其进化发展和水平的不同，以及生活环境的差异，在所属各目动物之间表现一些不同的变化。但总的规律是由具尾的幼体形态过渡为成体的形态。在无尾目变态期间经历了更显著的，肉眼可见的明显变化（图 13.13），从蝌蚪后肢芽出现开始进入前变态期（prometamorphosis）。在后肢发育基本完善后开始前肢的发育，在四肢生出后，进入变态顶峰期（metamorphic climax）。在此期间，蝌蚪的尾被不断分解，吸收，逐渐变短，最后完全消失。同时一些细微结构和其内部结构也经历了剧烈的变化。

1. 形态学的变化

在有尾目（蝾螈），这些变化包括尾鳍和背鳍的吸收，外鳃的消失和皮肤结构的变化，身体也变得扁平。在无尾目（蛙和蟾蜍）中，变态变化是非常显著的，而且几乎每个器官都是修饰改造的

对象(表 13.1)。退化的变化包括蝌蚪角质齿的脱落,口加宽,颚肌和舌肌发达,以适应从撕裂植物到扑食飞虫的摄食活动的改变。与此同时,感觉器官发生较大的变化,随着蝌蚪的侧线系统退化,眼和耳的结构发生一系列变化。眼球更加突出并移向背部,形成瞬膜和眼睑。蟾蜍蝌蚪分离的内、外角膜在变态初期后肢发育晚期,前肢出现前,首先在正对晶状体的中央部位开始愈合,在完成变态时全部愈合,并从此失去了诱导皮肤移植片转变为透明角膜的能力。眼中的色素也发生变化,在蝌蚪,像淡水鱼一样,视网膜中主要的感光色素是视紫质(prophyropsin),在成体中变为视紫红质(rhodopsin),一种陆生和海洋生脊椎动物所特有的感光色素。耳也经历了进一步的分化,中耳发育,鼓膜成为蛙和蟾蜍所特有的。由于从植食性向较多的肉食性的转变,特有的较大的消化管变短。内鳃被吸收消失,鳃弓退化,肺发育增大,肌肉和软骨进一步的发育,以便将空气泵入和泵出肺。为了适应陆上运动,前肢和后肢发育分化,适于水中游泳的桨状尾部被分解吸收。皮肤的结构发生变化,形成皮肤腺。

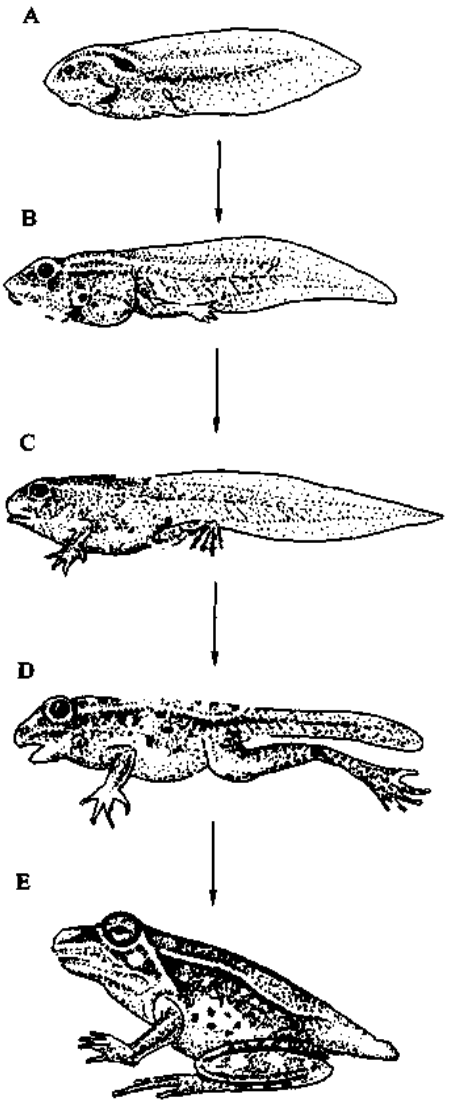


图 13.13　豹蛙(*Rana pipiens*)变态的顺序

A. 变态前的蝌蚪　B. 前变态期的蝌蚪,后肢的生长　C. 随着前肢的出现开始变态的顶峰期　D、E. 顶峰期

2. 生物化学的变化

早期的组织化学研究发现,在变态期间退化的器官(如尾、鳃)中出现 pH 降低和自由氨升高。反之,在新生成的器官中 pH 升高和自由氨降低。这说明在变态期间一些器官代谢情况的变化。现已对变态中以下几方面的生物化学变化进行了较深入的研究。

一是前面提到的眼内视色素的变化。在变态顶峰期,由蝌蚪期视网膜上的视紫质变为成体的视紫红质。前者是一种蛋白质,视蛋白(opsin)与维生素 A_2 的醛基之间结合形成的一种复合物(图 13.14)。而后者是由维生素 A_1 的醛基与视蛋白组成的。

二是血红蛋白在合成和生理功能特点方面的变化。这一情况是随着红细胞生成器官由肾改为脾和骨髓而出现的。在牛蛙(*Rana catesbeiana*)变态时,由蝌蚪的血红蛋白(HbF)完全变为成体的血红蛋白(HbA)的时间,刚好在蝌蚪的尾被完全吸收之前。这两种血红蛋白的生理特点和电泳表现都不相同。蝌蚪的血红蛋白比成体的结合氧要快一些,释放氧慢一些。另外,实验还证明,蝌蚪的血红蛋白结合氧是不依赖 pH 的,而蛙的血红蛋白(像大多数其他脊椎动物的一样)显示出与氧的结合随 pH 的升高而增加(Bohr 效应)。

表 13.1 在无尾两栖类一些变态变化的概况

系 统	幼 体	成 体
运动系统	水栖的、尾鳍	陆栖的、无尾四足动物
呼吸系统	鳃、皮肤、肺、血红蛋白	皮肤、肺、成体的血红蛋白
循环系统	主动脉弓，主动脉；前、后和公共主静脉	颈动脉弓，体动脉弓，颈静脉
营养系统	草食性：长而螺旋的肠－肠共生体、小口－角质颚，唇齿	肉食性：短肠－蛋白酶、大口、长舌
神经系统	缺少瞬膜、视紫质、侧线，茂特纳氏神经细胞	眼肌发育，瞬膜、视紫红质、侧线系统丧失，茂特纳氏神经细胞退化，鼓膜
排泄系统	中肾：主要氨代谢，有的排尿（排氨生物）	中肾：主要排尿，高活性的鸟氨酸酶－尿循环（排尿生物）

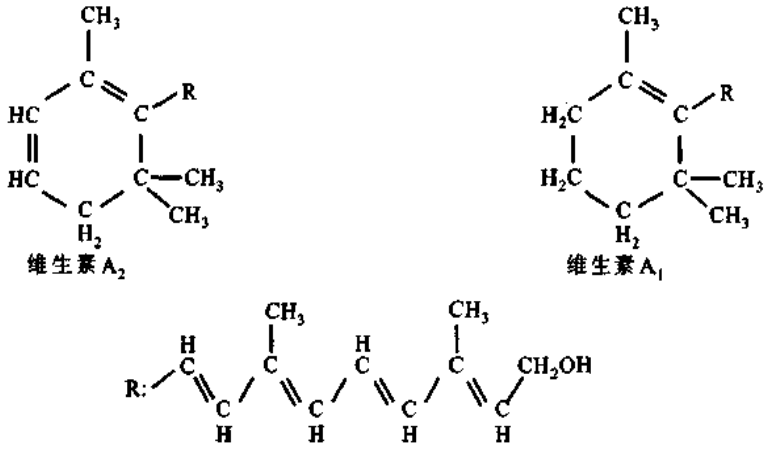


图 13.14 蝌蚪和蛙视色素维生素 A 部分的结构式

蝌蚪的视紫质（用维生素 A_2）比蛙的视紫红质（用维生素 A_1）吸收较长波长的光

三是皮肤中的生化变化。蝌蚪皮肤的角蛋白（keratin）变为成体皮肤的角蛋白。现已成功地从成体皮肤中分离出角蛋白的 mRNA。另外，在整个变态期间有大量透明质酸酶合成，其作用是消化皮肤中的透明质酸。到变态结束时，这种物质已完全被氨基多糖所替代。在变态期间，皮肤中胶原的合成和沉积方式也发生改变。以上变化与适应陆栖生活，皮肤变得坚韧有关。

最后，变态中最明显的生化变化可能是产生尿素所需酶的诱导。两栖类蝌蚪像大多数淡水鱼一样是排氨的（ammonotelic），而成体的蛙和蟾蜍像大多数陆生脊椎动物那样，是排尿的（ureotelic）。即由氨代谢转变为尿代谢（图 13.15）。尿素和氨都溶于水，但尿素的毒性更大。

尿素生成后可暂时贮存于血液中，然后由肾排出。以排出同量含氮废物为准，排尿比排氨法可以减少水分损失，有利于陆上生活。在变态期间，肝形成从二氧化碳和氨产生尿素所需的酶，如甲氨酰磷酸合成酶、鸟氨酸氨甲酰基转移酶、精氨基琥珀酸合成酶和精氨基琥珀酸裂解酶，它们在肝中构成尿素循环（urea cycle），而且发现在变态期间这四种酶的合成都升高了（图 13.16）。

二、两栖类变态的激素控制

有关两栖类变态由激素控制的研究始自本世纪初。最先由 Gurdernatch（1912）发现，用羊的甲状腺组织喂养蝌蚪可引起提前或加快变态。此后另外一些实验的结果证明，如果切除早期蝌蚪

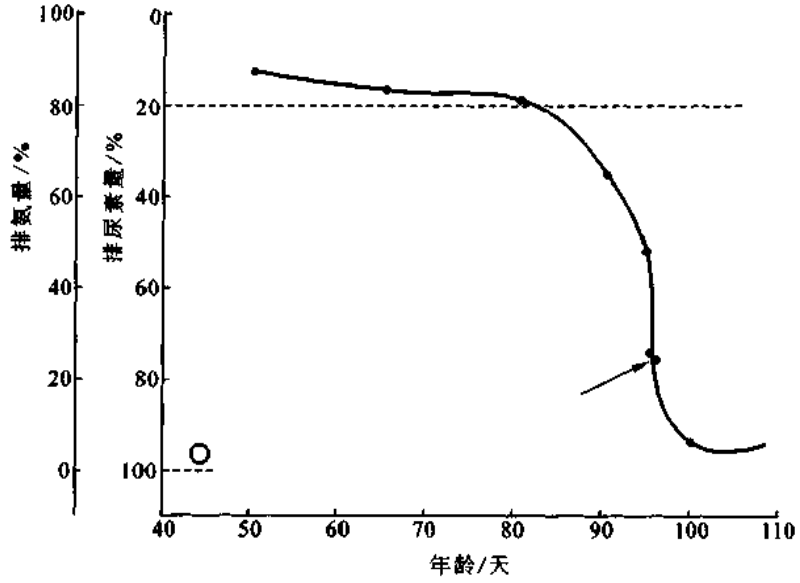


图 13.15　林蛙(*Rana temporaria*)由蝌蚪氨代谢向成体尿代谢的转变过程(自 Frieden,1961)
O. 排氨量　箭头. 前肢露出体外的时间

的甲状腺原基，则这些蝌蚪永远不会变态，而是发育成大的蝌蚪，如果蝌蚪的生活环境严重缺碘，变态也不能进行。这表明甲状腺和碘在两栖类变态中起重要的作用。

现已证明，两栖类变态期间发生的形形色色的变化，都是由甲状腺分泌的激素，甲状腺素(thyroxine，T_4)和三碘甲腺原氨酸(triiodothyronine，T_3)引起的(图 13.17)。

现已证明，T_3 是极活跃的一种激素，它以比 T_4 低得多的浓度，在切除甲状腺的蝌蚪中引起变态的变化。在有尾类和无尾类中，幼体期甲状腺只产生少量的 T_3 和 T_4，在变态前期约 1.3 n mol/L。尽管在幼虫发育后期浓度持续增加，但终究达不到使幼体进入变态所需的水平，这是因为在垂体分泌的催乳激素(prolactin)的作用下，抑制了甲状腺激素的作用。催乳激素是一种幼虫生长激素，促进幼虫的生长，但它又通过抑制甲状腺激素而抑制两栖类的变态。在变态期间，甲状腺激素 T_3 和 T_4 的浓度增加，在变态初期仅约 4～26 n mol/L，到变态顶峰期其浓度高达 326 n mol/L。在绿红东美螈(*Diemyctylus viridescens*)中，甲状腺激素在发育晚期被催乳激素所抑制，所以引起成体动物返回水中产卵。因此在一些蝾螈中存在两次变态：第一次是由甲状腺激素刺激的；第二次则是由催乳激素诱导的。另外，即使在第二次变态以后，注射甲状腺激素将使成体蝾螈返回到陆上，成为干皮肤的蝾螈。

另外，T_3 的释放还处于下丘脑合成的激素的控制之下。在幼虫变态前的生长期，脑的这一部分是发育不完全的，所以下丘脑对腺垂体不产生控制(图 13.18)。在缺少下丘脑的调节时，神经垂体分泌高水平的催乳素，而腺垂体很少或不分泌促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone，TSH)。因此，T_3 的水平是低的，而催乳素的水平是高的。随着下丘脑的发育，它分泌的促甲状腺素释放激素(thyrotropin-releasing hormone，TRH)引起垂体中 TSH 水平的升高，TSH 的升高又引起甲状腺增加 T_3 和甲状素的合成。因此，由甲状腺分泌的 T_3 的浓度逐渐增加，直到变态的第一批变化(初变态期)出现。T_3 水平的升高也刺激垂体的正中隆起进一步发育，它调节 TRH 流向腺垂体。这是在 T_3 生成中由 T_3 的增多引起一种正反馈(positive feedback)作用。另外，下丘脑开

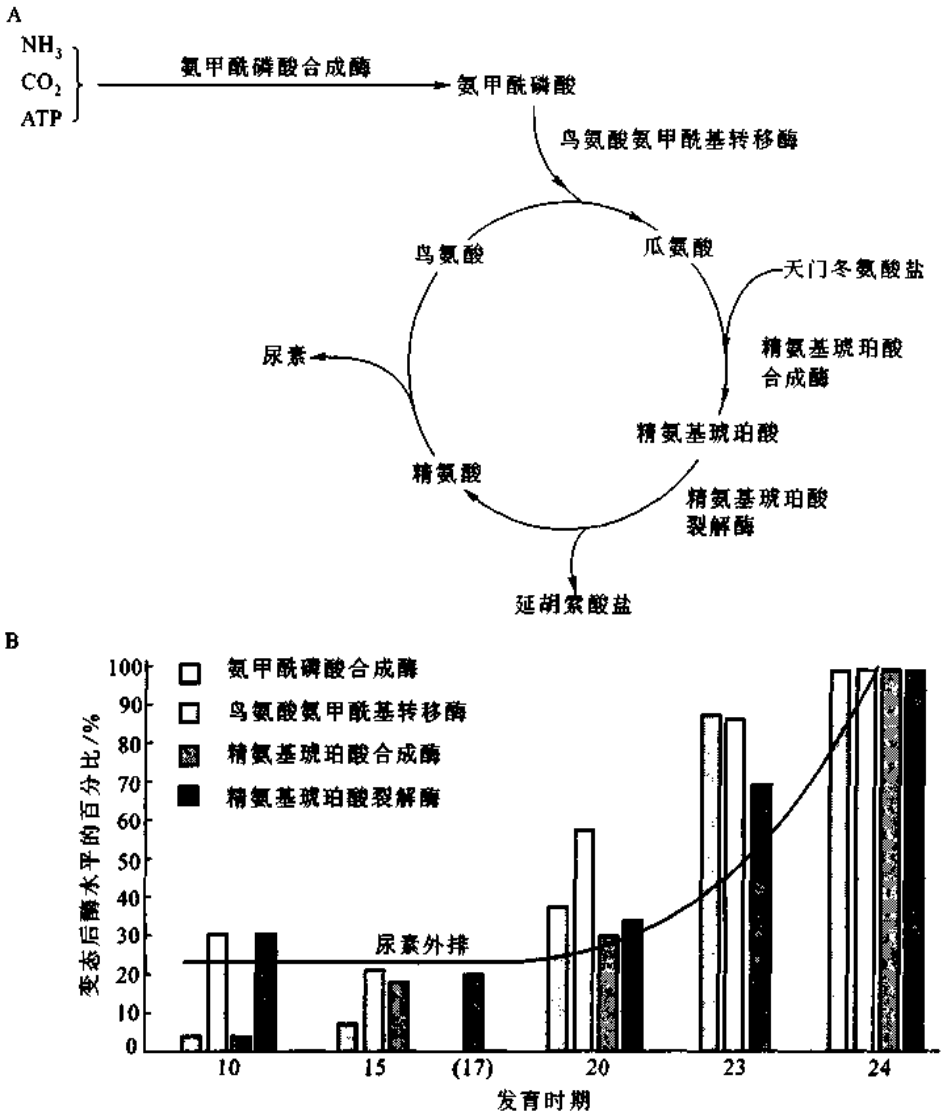
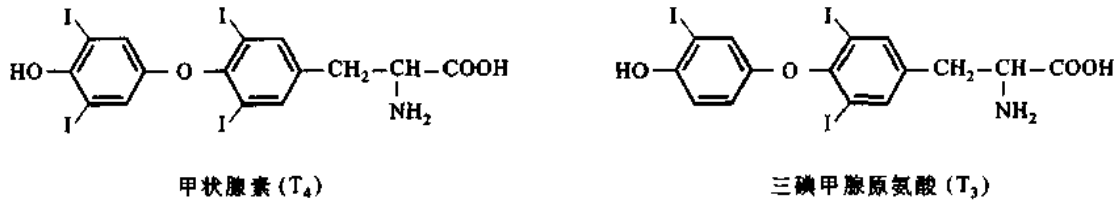


图 13.16 在无尾两栖类变态期间尿素循环的发育

A. 尿素循环的主要特点,通过它含氮废物被解毒并排出 B. 在牛蛙(*Rana catesbeiana*)中,与变态变化相关的尿素循环的酶活性的形成



甲状腺素(T_4) 三碘甲腺原氨酸(T_3)

图 13.17 甲状腺素(T_4)和三碘甲腺原氨酸(T_3)的结构式

始分泌催乳素释放抑制因子(PRIF),抑制垂体合成催乳素。因此,T_3 对催乳素的比率就大大增加,这导致变态的顶峰期(图 13.18)。此时与变态相关的大多数发育事件发生。变态对甲状腺的

影响是它部分的退化，另外高水平的 T_3 可能对 TSH 或 TRH 产生一种抑制的影响。上述这种相互作用的方式，使与变态相关的各种激素的合成和分泌得到不断的新的平衡。综上所述，两栖类的变态过程实际上是甲状腺受垂体和下丘脑的抑制和反抑制间不断出现新平衡的过程，不管甲状腺激素和催乳素是在高水平或是低水平上进行，变态总是受正负两种因素的动态平衡所调控。

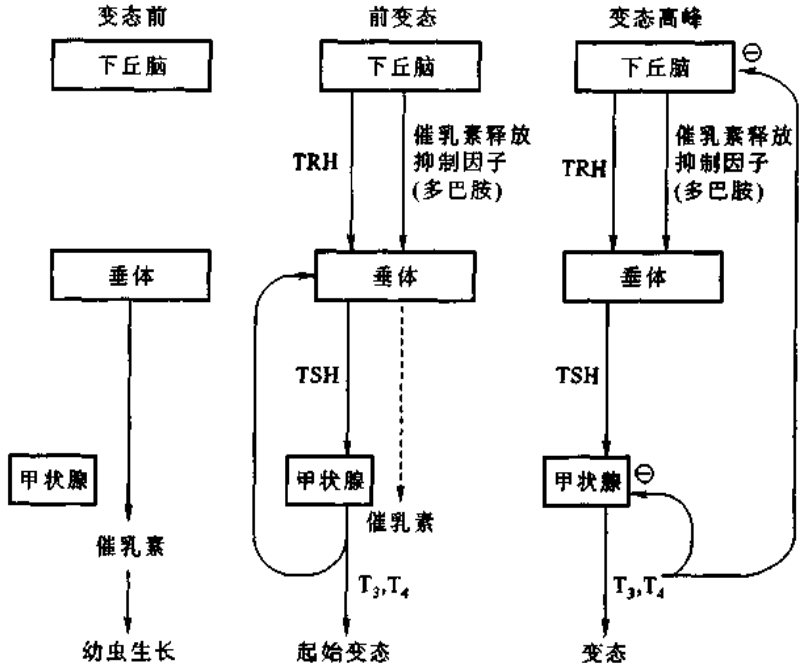


图 13.18　在无尾类变态的不同时期下丘脑－垂体－甲状腺系统

随着下丘脑的发育，它刺激垂体指令甲状腺激素的分泌和抑制催乳激素的分泌

T_3. 三碘甲腺原氨酸　　T_4. 甲状腺素 TSH、促甲状腺激素　　TRH. 促甲状腺素释放激素

身体的不同器官对激素的刺激产生不同的反应。相同的刺激，在不同的激素浓度，或不同量的积累的情况下，将引起某些组织退化，而引起另一些组织发育和分化。

1. 尾的退化和吸收

两栖类变态中，尾退化明显的是与甲状腺激素的增加相关的。由于此时骨骼还没有长入尾中，只是被脊索支持着，因此尾部结构的退化是相对迅速的。通过体外培养实验证明，将分离的尾部片段置于凝胶覆盖的培养皿中，那些生长于未经化学物质处理的培养基中的尾是健康的，而那些在用甲状腺激素处理过的培养基中的尾经历了特有的退化(图 13.19)。另外，催乳素能抑制由甲状腺激素诱导的尾部的退化。

尾的退化是分四个阶段发生的：第一，在尾的肌细胞中蛋白质的合成减少。第二，溶酶体酶增加，如细胞自溶素 D(一种组织蛋白酶)、RNA 酶、DNA 酶、胶原酶、磷酸酶和一些糖苷酶的浓度，在表皮、脊索和神经索细胞中都增加了。第三，这些酶被释放到细胞质中引起细胞死亡。表皮可能通过释放这些消化酶帮助消化肌组织。如将表皮手术地从尾部顶端除去，并培养于甲状腺激素中时，它将不退化。第四，在细胞死亡以后，巨噬细胞将聚集于尾区，用自身的蛋白水解酶消化这些被破坏的碎片。结果尾成了一个蛋白水解酶的大囊(图 13. 20)。

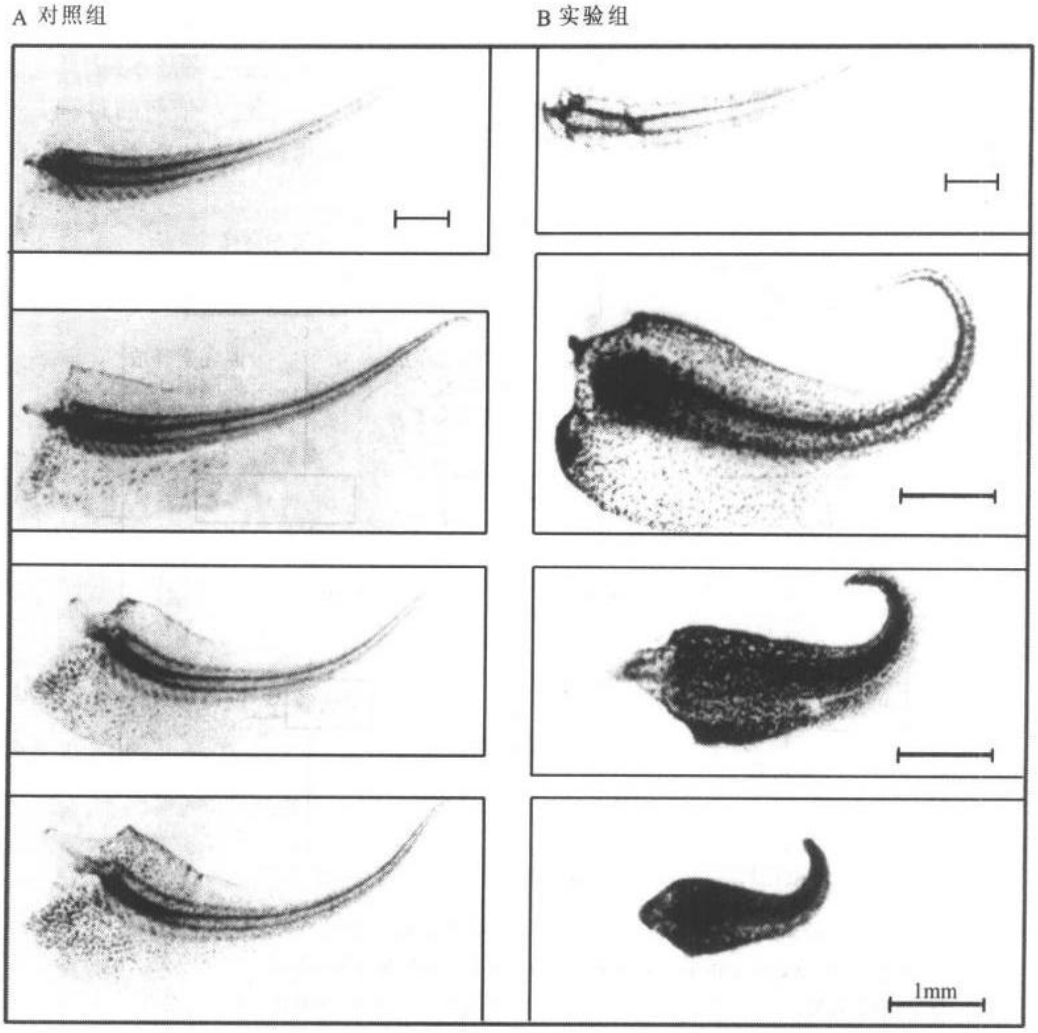


图 13.19 在甲状腺激素影响下分离的尾端的退化

A. 在 Holtfreter 盐溶液中培养 6、8、10 和 12 天(自上至下)对照爪蟾的尾端 B. 在盐溶液中加入甲状腺激素处理，并培养相同时间的爪蟾尾端

移植实验清楚地证实，尾对甲状腺激素具有特异性反应。当将尾端移植到躯干部或将视杯移植到尾部时，置于躯干部的尾不会防止退化，而置于尾部的视杯保持其完整性(图 13.21)。

2. 皮肤的变态变化

表皮对甲状腺激素的反应依赖于身体被此表皮覆盖的部分。头部和身体的表皮细胞正如在皮肤期待的那样，T_3 并不改变它们的分化和分裂的速率。然而，在尾部 T_3 引起表皮细胞角质化作用和死亡的迅速增加，它也能引起产生更多表皮细胞的干细胞分裂的一种尾部特异的抑制。结果是尾部的表皮细胞死亡，而头部和身体的表皮细胞继续起作用。这表明甲状腺激素的反应只限于器官本身，而不依赖周围的组织。移植实验证明，这些局部的表皮细胞的反应好像是被真皮中胚层的区域特异性所控制的。当移植尾部的生皮节细胞(它们产生尾部的真皮)到躯干部时，接触的表皮将在变态时退化；相反，当移植躯干部的生皮节到尾部时，移植区的皮肤被保留下来。改变外胚层并不会改变对甲状腺激素的区域性反应。

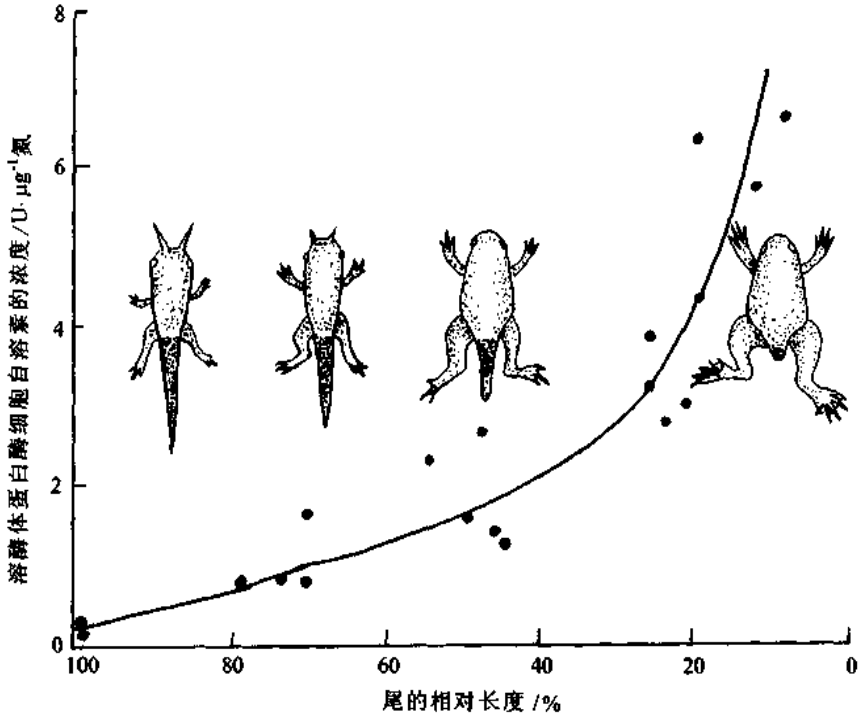


图 13.20　在爪蟾(*Xenopus laevis*)蝌蚪尾退化期间溶酶体蛋白酶细胞自溶素的增加
溶酶体蛋白酶被认为负责消化尾的细胞

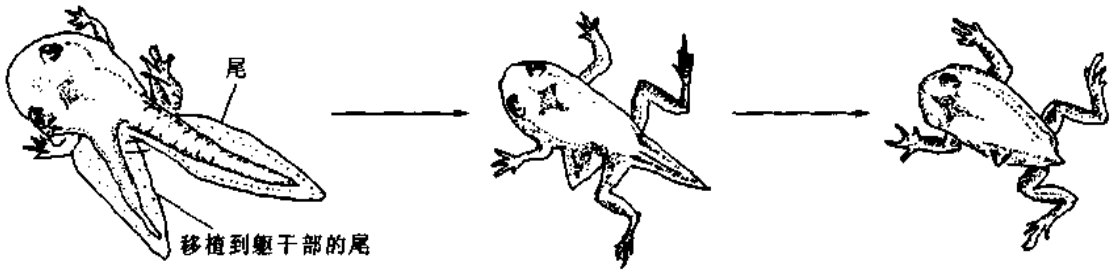


图 13.21　在蛙变态期间器官的特异性
尾部即使被移植到躯干部仍退化

3. 肝的变态变化

肝变态变化与其他器官(如尾)不同的是,后者通过幼虫细胞的死亡或吸收以换取成体细胞的发育和生长,而肝的幼虫细胞在变态后被保留下来并继续增殖,这在动物变态的组织中是极其独特的。

在变态期间,肝内许多显微和亚显微构造进行了重组。新、旧核糖体的替换即属此。实验证明,经甲状腺激素处理后,肝内既有大量新核糖体的合成,又有相当数量的旧核糖体被分解,因而在一定时间内肝中核糖体只保持总量的恒定而无积累。通过这一途径,旧的核糖体最后完全被新的核糖体取代。与此同时,与核糖体合成有关的糙面内质网相应增加。在构造上也发生相应变化,当用甲状腺激素处理后,糙面内质网不像变态前那样呈单层结构,而变成双层结构。再则,通过增殖,其分布亦由核周围区域扩散到遍及细胞质各处。在变态期间,肝细胞核也由变态前的

常染色质，变为变态开始后的异染色质。后一情况表明 RNA 转录不是非常活动的。另外，肝细胞内还有一些细胞器发生变化，其中以线粒体的变化较突出，它们不但体积增大，而且数量也增多。在早期的蝌蚪中，其线粒体嵴为宽片状，变态开始后变为细管状，同时整个线粒体也由长形变为圆形或卵圆形。这些新型的线粒体多与新形成的糙面内质网紧密相连，推测此连接处可能就是甲氨酰磷酸盐合成酶和鸟氨酸转甲氨酰酶的合成位点。

肝在变态期间的形态结构的变化是由于核糖体和信使 RNA 合成的明显增加，以及蛋白质合成的速率在甲状腺激素刺激 4 小时内增加近 100 倍完成的。许多这种新的 mRNA 是编码成体肝新的功能所需的。在蛋白质合成中的这种大量增加，好像是新的 mRNA 转录。现已证明，注射放线菌素 D 到正常的变态前的蝌蚪中，抑制了蝌蚪尾的退化和头的调整。而酶的合成甚至在变态变化之前就已开始，数目有 5 种(参见图 13.16A)，它们皆与尿循环有关。据此可以认为，这些酶的出现就是由氨循环向尿循环过渡的标志。在变态期间，这些酶以不同的速度提高活力(参见图 13.16B)。在变态期间，作为尿循环的关键性酶，甲胺酰磷酸盐合成酶(carbamylphosphate synthetase)的比活性增加 30 倍。不论是在自然变态，还是在人工诱导的变态中，上述 5 种酶均同时出现，证明它们对甲状腺激素刺激的反应具协同性。免疫技术的研究发现，甲氨酰磷酸盐合成酶在合成之初是没有活性的。其活力是在变态变化即将开始之前出现的，而后逐渐增加。体外培养和体内的实验结果表明，此酶活力的出现与激素刺激有直接关系。

4. 变态期间神经系统的变化

在无尾类变态期间一个很容易直接观察到的变化是，眼从它起初的侧部位置移向背前方(图 13.22)。同时，其视网膜神经节细胞的神经支配在蝌蚪期只投射到对侧的脑，而不投射到同侧脑。然而在变态期间，形成了附加的同侧神经投射的新途径，从而使两眼来的输入能到达相同的脑区。在爪蟾中，这些神经支配的新途径不是由已存在的神经元调整的结果，而是由于对甲状腺激素反应新分化形成的神经元。眼移动到它的新位置和伸出突起到同侧脑的新神经元的分化二者都是依赖甲状腺激素的变化。

另外一些神经元在变态期间也经历了明显的变化。一些神经支配到尾部肌肉的神经元死亡了。这些神经元的死亡并不类似于由于靶组织丧失而引起的死亡，而好像是对甲状腺激素的一种独立的反应。另一些神经元，如支配到蝌蚪颚中的运动神经元，由神经支配蝌蚪的肌肉改变到新形成的成体肌肉。还有其他神经元，如神经支配到舌上的(一种在蝌蚪期不存在，变态时新形成的肌肉)神经元，在蝌蚪期它们已蛰伏着，在变态期首先形成神经接触。脑在变态期也经历了结构上的一些变化。

因此，无尾类的神经系统在变态期间经历了巨大的重组。一些神经元死亡了，另一些神经元诞生了，而其他一些则改变了它们的神经支配特性。通过这些方式机体能更好地适应它们的改变了的新的生活环境。

最后，变态过程中涉及的一个主要问题是发育事件的相互协调。如尾在其他运动器官附肢已发育时才退化，而鳃在动物能利用新发育的肺时才退化。协调变态事件的工具好像是，产生不同的特异的影响需要不同数量的激素。这种模式称为阈值的概念(threshold concept)。在变态开始后，一系列形态变化，如后肢长大，肠缩短，前肢生出，角质颚脱落，尾部萎缩和口变阔等，均按一定程序进行。其原因也在于这些器官对甲状腺激素有不同的感受水平。其中，越居上述序列之前者，对甲状腺激素越敏感，从而对激素浓度的要求越低。因此，对激素要求低阈值者必然反应在先，

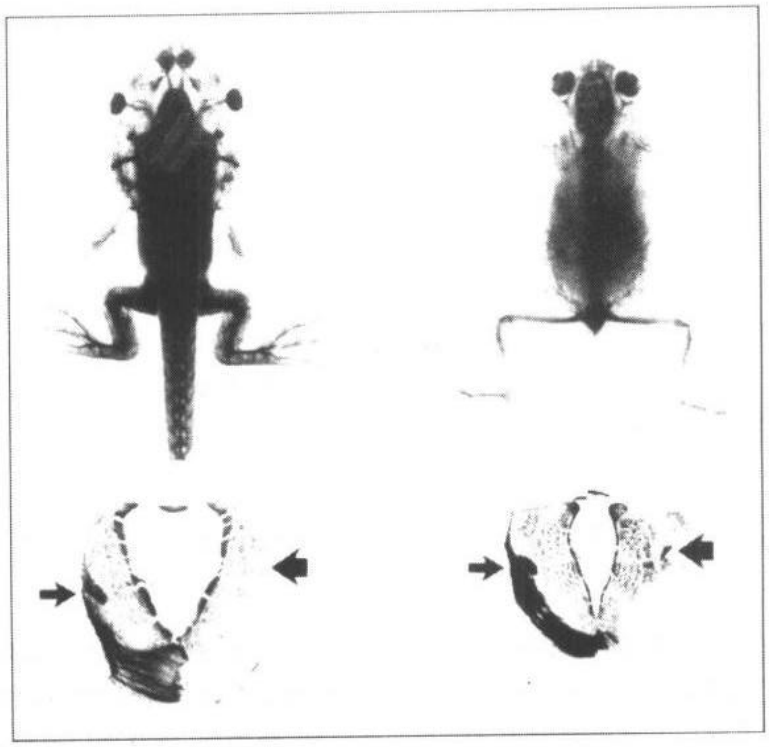


图 13.22　在爪蟾(*Xenopus laeve*)蝌蚪变态期间眼位置的移动和与之相联系的神经元的变化

蝌蚪位于两侧的眼只产生相对小的双目视野。在变态期间眼移向背前方，为成蛙产生一个大的双目视野。变态蝌蚪的下方是其脑的视区的切面。当将辣根过氧化物酶注射入视网膜时，视神经元将辣根过氧化物酶转移到脑对侧的位置(小箭头示)，而不到同侧的位置。随着变态的继续，发现开始出现同侧的投射(包含双目视觉，大箭头示)

要求高阈值者反应在后。正是从这一情况出发，有人提出，变态的时空问题受控于甲状腺激素的浓度，而变化程序的形成则取决于不同组织对激素处理的敏感性。

三、变态期间对甲状腺激素的分子反应

在甲状腺激素的作用下，靶组织得以实现其生化变化的首要步骤是该激素与细胞受体的结合。通常，低相对分子质量的激素(如甲状腺激素和性类固醇激素)是能穿过细胞膜并结合于细胞内的特异受体。然而肽激素常常留在细胞外，通过结合细胞膜上特异的受体来完成其功能。它在与受体结合后，激活一种膜结合的酶，即腺苷酸环化酶(adenylate cyclase)，它再转变 ATP 为环化 AMP(cAMP)。cAMP 此后能改变被细胞合成的蛋白质的类型。有人认为，下丘脑分泌的 TRH，通过结合一组能形成 TSH 的垂体细胞上的 TRH 受体起作用。这种结合刺激细胞的腺苷酸环化酶生成更多的 cAMP，cAMP 起一种"次级信使"的作用，指令垂体细胞合成并释放 TSH。在甲状腺细胞上 TSH 的作用也被认为是由 cAMP 调节的。现已肯定细胞质受体的存在。Freiden 等(1968)通过研究首先发现，在许多幼体组织的细胞质内都含有与 T_3 不同亲和力的酸性蛋白。此后，其他人又相继发现，牛蛙蝌蚪的肝细胞核上约有 12 300 个与 T_3 的结合位点，但与 T_4 的结合位点仅有 2 300 个左右；在尾部，每个细胞核与 T_3 的结合位点最多可达 1 500 个，而与 T_4 的至多 800 个。在尾鳍上的受体与 T_3 的亲和力较与 T_4 的高 250 倍。这说明为什么在正常情况下 T_3 比 T_4 更活

跃。

用牛蛙变态前和变态的蝌蚪的放射性 mRNA 进行杂交以克隆基因的实验已证明，对甲状腺激素的三类反应：在天然的或用甲状腺激素诱导的变态中，一组基因的转录增加了；另一组基因的转录明显地减少了；而第三组基因保持不受甲状腺激素的影响。通过实验研究已经证实，甲氨酰磷酸盐合成酶的大量增加归因于那个转录增加的基因。因此，变态在某种程度上是在转录水平上被控制的。另外的一个证据也表明甲状腺激素有能力在转录水平上调节基因的活性。哺乳动物中与 T_3 结合的蛋白质已被分离出来，而且表现出与那些把固醇类激素带到 DNA 的甾类激素结合蛋白质有明显的相似性。实际上，与 T_3 结合的蛋白质中含有一个区域，它能与在跟 T_3 反应的基因的启动子区中发现的特异 DNA 序列相结合。这并不意味转录是在变态期间起作用的基因调节的唯一水平，但却是其中重要的一个。

第三节 在乳腺发育中多种激素的相互作用

激素在发育中具有组建和破坏的双重作用。在变态中，激素指令一些细胞死亡，而指令另一些细胞形成新的器官。在哺乳动物乳腺的发育中，不同的激素给发育不完全的组织提供不同的信息，指导乳腺的发育。乳腺的发育被划分为三个不同的时期：胚胎期、青春期以及妊娠和哺乳期。乳腺分化的产物——酪蛋白和其他乳蛋白，只在最后时期产生。

1. 胚胎期 在雌性小鼠的正常发育中，在妊娠 11 天两条隆起的表皮组织带出现在小鼠腹中线的两侧，称为乳腺嵴(mammary ridge)。在每一个嵴中，细胞浓缩集合于嵴的中央，并保留在那里，形成乳腺芽基(mammary bud)。在小鼠中每侧有 5 个芽基，在人类每侧只有 1 个。在临近出生前 1 天，这些地方的上皮迅速增生，产生乳腺索(mammry cord)，这条索在靠近皮肤的一端开口，形成乳头，而它的另一端开始分支成管。至此发育停止，直到青春期(puberty)。

在雄性小鼠乳腺组织的发育直到妊娠 13～15 天与雌性的相同。此时间质围绕着中央的乳腺芽基收缩，而乳腺带内的细胞开始死亡。因此只有一个小的上皮细胞带从皮肤分离出来，乳腺带并没有伸展到皮肤表面。乳腺不再进一步发育。

体外培养的实验进一步证明，取自雌性小鼠的乳腺芽基正常发育为连接到表面的小叶(图 13.23)。然而，当培养基中加入睾酮时，乳腺芽基发生退化。当培养雄性的乳腺芽基时，芽基退化，乳腺带中的细胞死亡，但在缺少睾酮的培养基中培养时，雄性乳腺芽基也将产生小叶。

睾酮通过指令间质细胞破坏表皮带引起特定细胞的死亡已由一系列重组实验所证明。在小鼠(同样也在人类)中有一种称为雄激素不敏感综合征(androgen insensitivity syndrome)的疾病。患这种病的，在染色体上为雄性(XY)的个体不能产生具有功能的睾酮受体。因此即使这些个体具有活跃分泌睾酮的睾丸，但不能对它起反应。结果这些个体发育出雌性的乳房。当分别从正常的和突变体的乳腺芽基中分离出间质和上皮细胞，并以不同的组合进行培养。有些培养中加入睾酮，而另一些不加。所得结果表明，当间质和上皮细胞都是野生型时，芽基发育为乳房组织，在加入睾酮时，间质细胞浓缩在芽基的周围将乳腺带断开。当正常的上皮与突变的间质(不对睾酮起反应)共同培养时，在睾酮存在的情况下发生正常的乳房发育。然而当突变的上皮与正常的间质共同培养时，加入睾酮引起乳腺带的退化。因此睾酮的靶组织是间质，而不是上皮。在雄性睾酮诱导乳腺的

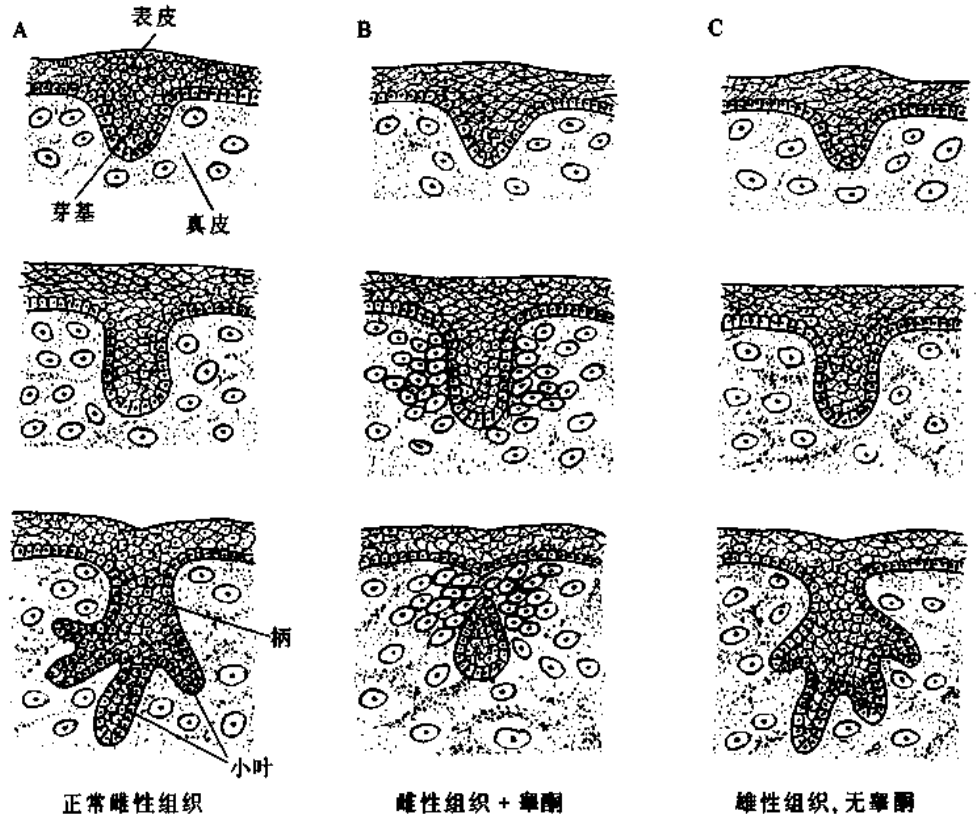


图 13.23　睾酮在调节乳腺发育中的作用

A. 雌性小鼠乳腺组织在体内或体外培养时将由上皮向下生长并分支　B. 雌性小鼠乳腺组织加入睾酮培养时，芽基伸长，但基质细胞聚集围绕在柄的周围，使其下部分断开，像正常雄性发育一样　C. 雄性小鼠的乳腺组织在缺少睾酮的情况下培养时，像雌性小鼠乳腺的正常发育一样

间质破坏相邻的上皮。这种作用对器官是特异的，在器官中没有其他器官的间质能杀死乳腺的上皮细胞，而且也没有其他的上皮能被乳腺间质破坏。

2. 青春期　在青春期(adolescence；小鼠第 4～6 周)乳腺的管系统广泛地增殖。在管顶部分泌乳汁的泡状细胞尚未分化和没有乳汁产生。广泛的细胞分裂是在雌激素和生长素控制下进行的。最新研究表明表皮生长因子(epidermal growth factor，EGF)在这个时期控制乳腺管的生长。当将缓慢释放 EGF 的塑料胶丸植入 5 周小鼠的乳腺中，这些小鼠的卵巢已经切除，它们的乳腺发育因此受阻。结果发现，靠近含 EGF 胶丸区域的乳腺管重新开始生长和形态学的发育，而离 EGF 胶丸较远区域中乳腺管不重新生长。另外，当乳腺的组织块与放射性的 EGF 一起孵育时，发现 EGF 结合于乳腺管的顶部，并与那些经历了有丝分裂的细胞相连接。因此可能 EGF 直接起作用引起青春期乳腺的生长。

在哺乳动物中，激素控制分化最明显的例子发生于人类的青春期。青春期是青年时代到成年时代的一个转变期。在青春期刚开始时，男孩和女孩具有相同比例的肌肉部分、骨骼部分和体脂肪，到青春期结束时，男人具有的肌肉部分和骨骼部分是女人的 1.5 倍，而女人的体脂肪是男人的 2 倍。另外，第二性征也在此时发育，表明从青春期的形态向成熟期成体的形态转变。妇女乳房的发育是被卵巢分泌的雌激素控制的。男性阴茎和睾丸的成熟是由从精巢释放的雄激素控制的。在

两个性别中，阴毛和腋毛发育是由雄激素控制的，此激素男人由睾丸分泌，女人由肾上腺分泌。由于雄激素的作用，男人还经历了喉及其附属的肌肉和软骨的伸长，导致声音变得深沉。在女性初次月经(menarche)代表了从卵巢排出发育的卵和激素周期的新结合。在男性，当生殖细胞开始减数分裂和生精小管中形成精子细胞，并由睾丸进入尿道通道可以排到体外时，表明到达性成熟，具有生殖能力。

人类青春期的激素基础非常类似于动物变态的。在两栖类和昆虫的变态中，发现二者都是由脑释放的神经激素起始的性激素的变化调节的(分别是 TRH 和 PTTH)。在人类两个性别中，青春期的变化是由下丘脑释放的促性腺素释放激素(gonadotropin - releasing hormone，GnRH)起始的(图 13.24)。像 TRH 一样，GnRH 是由下丘脑的神经元分泌释放到垂体的正中隆起(medial eminence)处，经血管送到腺垂体。引起促激素(tropic hormone)的释放。在人类青春期刺激释放黄体生成素(luteinizing hormone，LH)和促卵泡激素(follicle - stimulating hormone，FSH)，这两种激素称

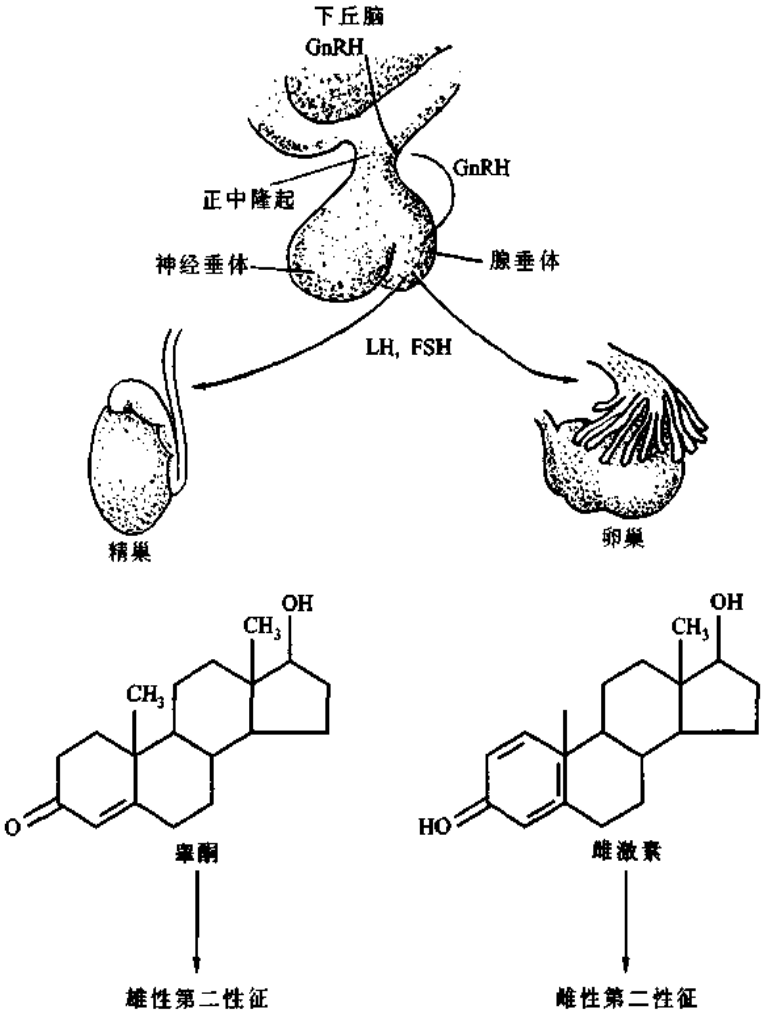


图 13.24 哺乳动物性别发育中下丘脑－垂体－性腺系统

为促性腺激素(gonadotropin)。它们在雄性刺激睾丸的发育,在雌性刺激卵巢的发育,作为这种刺激的结果,性腺分泌性激素(sex hormone);从睾丸分泌雄激素和从卵巢分泌雌激素。在青春期各种不同形态的和行为的变化是由这些激素对各种不同的靶组织起作用的结果。因此可以看出,青春期是一个受激素控制的发育的重新激活,并导致性成熟和在体型及生理学上的变化。它具有许多与在动物界看到的变态变化相类似的变化。

3. 妊娠期　在青春期和妊娠期(pregnancy)之间,小鼠乳房细胞在有丝分裂上是不活跃的,是未分化的。这种情况在妊娠后半期出现改变,在雌激素和孕激素的作用下,新的乳腺管形成,而管远端的细胞开始发育出分泌组织的特征。

当妊娠中期的乳腺在体外培养时,大多数细胞几乎不存在糙面内质网和高尔基体,也没有酪蛋白颗粒。当胰岛素或其他启动 DNA 合成的因子加入到培养基中时,这些细胞变得对其他激素起反应。糖皮质激素能诱导糙面内质网的形成,而催乳素此后能稳定酪蛋白 mRNA,以保证合适的乳汁蛋白质的合成(图 13.25)。

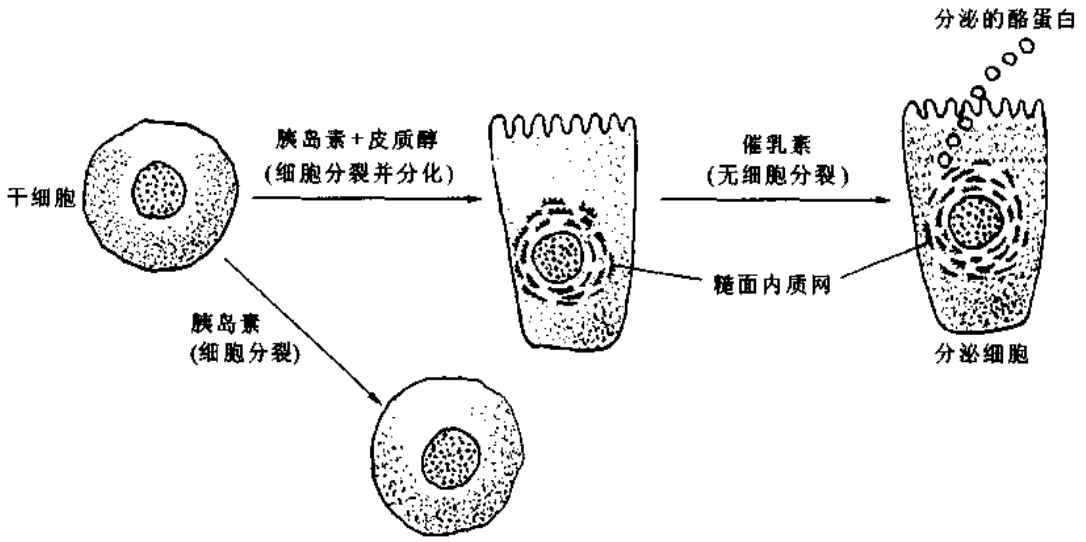


图 13.25　在体外培养条件下乳腺依赖激素的分化
(仿 Turkington,1968)

由上可见,在生命三个不同时期,胚胎期、青春期和妊娠期乳腺的发育受到几种激素复杂的相互作用。乳腺在正常的雄性中从不发育,在雌性直到成年在妊娠中期才变成一个完全不同的器官。

在发育的过程中,由于不同基因的表达,细胞开始分化,不同细胞类型的产生是由于表达不同的基因。但是每种细胞类型都来自同一个受精卵的有丝分裂,它们具有相同的基因组。因此不同类型的细胞利用相同基因组中不同的基因,即不同基因的表达。发育过程中细胞的分化包含了特定的基因在特异的地点和时间的不同表达。现在我们知道有大量不同的方式调节基因的表达,已在转录、RNA 加工以及翻译和蛋白质修饰的水平进行了广泛的研究。研究证明激素在一些方面通过调节基因的表达控制发育和细胞的分化(见第四篇)。

参考文献

1 Alley K E, Barnes M D. Birthdates of trigeminal motor neurons and metamorphic reorganization of the jaw myoneural system in frogs. J. Comp. Neorol., 1983, 218:395～405

2 Bowers W S, Fales H M, Thompson M J, *et al*. Identification of an active compound from balsam fir. Sience, 1966, 154:1 020～1 021

3 Brown P S, Frye B E. Effect of prolactin and growth hormone on growth and metamorphosis of tadpoles of the frog *Rana pipiens*. Gen. Comp. Endocrinol., 1969, 13:139～145

4 Buckbinder L, Brown D D, Expression of the *Xenopus* prolactin and thyrotropin genes during metamorphosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90:3 820～3 824

5 Cohen P P. Biochemical differentiation during amphibian metamorphosis. Science, 1970, 168:533～543

6 Cohen P P, Brucker R F, Morris S M. Cellular and molecular aspects of thyroid－hormone action during amphibian metamorphosis. Horm. Prot. Peptides, 1978, 6:273～381

7 Crew M D, Spindler S R. Thyroid hormone regulation of transfected rat growth hormone promoter. J. Mol. Biol., 1986, 261:5 018～5 022

8 Currie J, Cowan W M. Evidence for the late development of the uncrossed retino－thalamic projection in the frog *Rana pipiens*. Brain Res., 1974, 71:133～139

9 Etkin W, Gona A G. Antagonism between prolactin and thyroid hormone in amphibian development. J. Exp. Zool., 1967, 165:249～258

10 Fristrom J W, Fristrom D, Fekete E, *et al*. The mechanism of evagination of imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. Am. Zool., 1977, 17:671～684

11 Gilbert S F. Developmental Biology. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc, 1991. 685～717

12 Kaltenbach J C, Fry A E, Leius V K. Histochemical patterns in the tadpole tail during normal and thyroxine－induced metamorphosis. II. Succinic dehydrogenese, Mg－ and Ca－adenosine triphosphatase, thiamine pyrophosphatase, and 5′ nucleatidase. Gen. Comp. Endocrinol., 1979, 38:111～126

13 Kollros J J. Mechanisms of amphibian metamorphosis: Hormones. Am. Zool., 1961, 1:107～114

14 Little G, Atkinson B G, Frieden E. Changes in the rates of protein synthesis and degradation in the tail of *Rana catesbeiana* tadpoles during normal metamorphosis. Dev. Biol., 1973, 30:366～373

15 Lyman D F, White B A. Molecular cloning of hepatic mRNAs in *Rana catesbeiana* response to thyroid hormone during induced and spontaneous metamorphosis. J. Biol. Chem., 1987, 262:5 233～5 237

16 Nishikawa A, Kaiho M, Yoshizato K. Cell death in the anuran tadpole tail: Thyroid hormone induces karatinization and tail－specific growth inhibition of epidermal cells. Dev. Biol., 1989, 131:337～344

17 Pratt G E, Jennings R C, Hammett A F, *et al*. Lethal metabolism of precocene－1 to a reactive epoxide by locust corpora allata. Nature, 1980, 284:320～323

18 Rountree D B, Bollenbacher W E. The release of the prothoracicotropic hormone in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, is controlled intrinsically by juvenile hormone. J. Exp. Biol., 1986, 120:41～58

19 Turkington R W. Hormone－dependent differentiation of mammary gland in vitro. Curr. Top. Dev. Biol., 1968, 3: 199～218

20 Wassersug R J. Locomotion in amphibian larvae (or why aren't tadpoles built like fish). Am. Zool., 1989, 29:65～

84

21 Weinberger C, Thompson C C, Ong E S, *et al*. The *cerb* – *A* gene encodes a thyroid hormone receptor. Nature, 1986, 324:641～646

第十四章　性腺发育和性别决定

个体性别决定的机制自古以来一直是胚胎学研究的一个重大课题。但在很长一段时期内人们认为环境，特别是热量和营养在性别决定中起重要的作用。有关性别决定的这种观点直到 1900 年重新发现孟德尔(Mendel)的工作和 1902 年 McClung 重新发现性染色体之前一直作为性别决定的主要科学理论。

Correus 根据孟德尔学说的知识假设，如果作为某种性别决定的因子，雄性是杂合的(heterozygous)，雌性是纯合的(homozygous)，那么可以实现大多数物种的性别比率为 1∶1。在 1905 年之前就已发现，在昆虫中雌性具有 XX 性染色体和雄性具有 XY 或 XO 性染色体的相互关系。这表明特异的核成分负责性别表现型(sexual phenotype)的发育。因此，多年积累的证据表明性别决定是通过核的遗传产生的，而不是由于环境的偶然事件。

今天，我们发现环境的和内在的机制二者能在不同物种的性别决定中起作用。在讨论 性别决定的不同机制之前，我们首先了解有关性腺(gonad)发育的基本过程。

第一节　哺乳动物性腺的发育

性腺发育是一种独特的胚胎学情况。所有其他的器官原基通常只能分化为一种器官类型，如肺原基只能变为肺，肝原基只能发育成肝。然而性腺原基正常具有两种选择，当它分化时，它能发育为或是卵巢(ovary)，或是精巢(testis)。性腺原基采取分化的类型决定了机体将来性别的发育。在作出这一决定之前，哺乳动物性腺发育先通过一个未分化时期(indifferent stage)，此时的性腺既不具有雌性的特点，也不具有雄性的特点。人类性腺原基在妊娠 4 周时出现于中间的中胚层，直到 7 周之前一直处于未分化状态。在性腺未分化时期，生殖嵴(genital ridge)上皮增生进入其上方的疏松结缔组织中(图 14.1A,B)。此上皮层形成生殖索(sex cords)。在人类妊娠 6 周时，它将包围在迁入性腺的生殖细胞(germ cell)周围。在 XY 和 XX 两种性腺中，生殖索保持与上皮连接。

如果胎儿是 XY，那么生殖索到妊娠 8 周一直在持续增殖，并向深处延伸到结缔组织中。这些生殖索彼此愈合，形成内部的生殖索网(sex cord)和在最远端较细的睾丸网(rete testis；图 14.1C,D)。最后睾丸索失去与表面上皮的连接，并被一层厚的细胞外基质，白膜(tunica albuginea)将它们分隔开。因此生殖细胞处于睾丸的生殖索中。在胎儿和童年期这些生殖索一直是实心的，然而到青春期变成中空的，形成生精小管(seminiferous tubele)，而生殖细胞开始精子形成。精子通过与输出管(efferent duct)连接的睾丸网从睾丸内部被运送出去。这些输出管是中肾的残余物，它们将睾丸连接到乌尔夫氏管(Wolffian duct)。乌尔夫氏管通常是中肾的收集管，在雄性分化形成输精管(vas deferen)，精子通过输精管进入泄殖腔(urethra)并排出体外。在胎儿发育时期，睾丸中的间质细胞已分化为睾丸间质细胞(Leydig's cell)，它们能分泌睾酮(testosterone)。睾丸索的细胞分化为

支持细胞(sertoli cell),它们为精子提供营养和分泌抗乌尔夫氏管的激素。

雌性的生殖细胞位于靠近性腺的外表面。不像雄性的生殖索继续增殖,在 XX 性腺中,起初的生殖索退化。然而,很快上皮产生一组新的生殖索,它并不深入到基质中,而是停留在性腺的外表面(皮质)的附近。因此,它们称为皮质生殖索(cortical sex cord)。这些生殖索断裂成簇,每个簇围绕着一个生殖细胞(图14.1,E、F)。此时生殖细胞将变为卵(ova),围绕的上皮生殖索将分化为颗粒

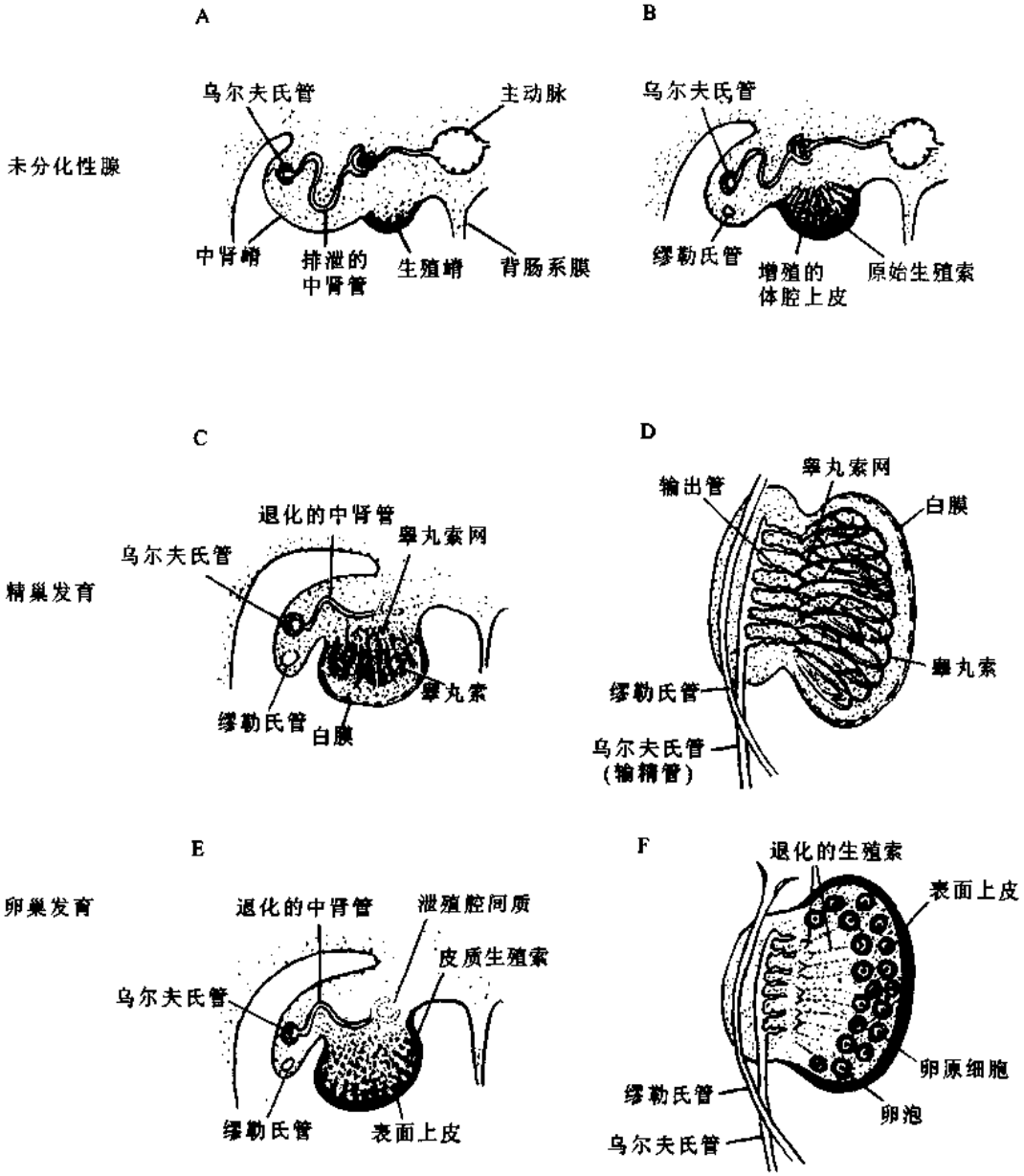


图 14.1　人类性腺分化(横切面)

A. 4 周胚胎的生殖嵴　B. 6 周未分化性腺的生殖嵴,示原始生殖索　C. 8 周胚胎睾丸的发育,生殖索失去与皮质上皮的连接发育为睾丸网　D. 16 周睾丸索与睾丸网相连并连接于乌尔夫氏管　E. 8 周人胚中随着原始生殖索的退化,卵巢的发育　F. 20 周人类卵巢并不与乌尔夫氏管连接,而新生的皮质生殖索围绕着已迁入生殖嵴的生殖细胞

细胞(granulosa cell)，而卵巢间质细胞分化为卵泡膜细胞(thecal cell)。卵泡膜细胞和颗粒细胞共同形成卵泡(follicle)，围绕着生殖细胞。它们能分泌类固醇(steroid)激素。每个卵泡只含有一个生殖细胞。雌性的缪勒氏管(Müllerian duct)保持完整并分化为输卵管(oviduct)、子宫(uterus)、子宫颈(cervix)和上阴道(upper vagina)。乌尔夫氏管因为丧失了睾酮的影响而退化。哺乳动物生殖系统发育的概况如图 14.2。

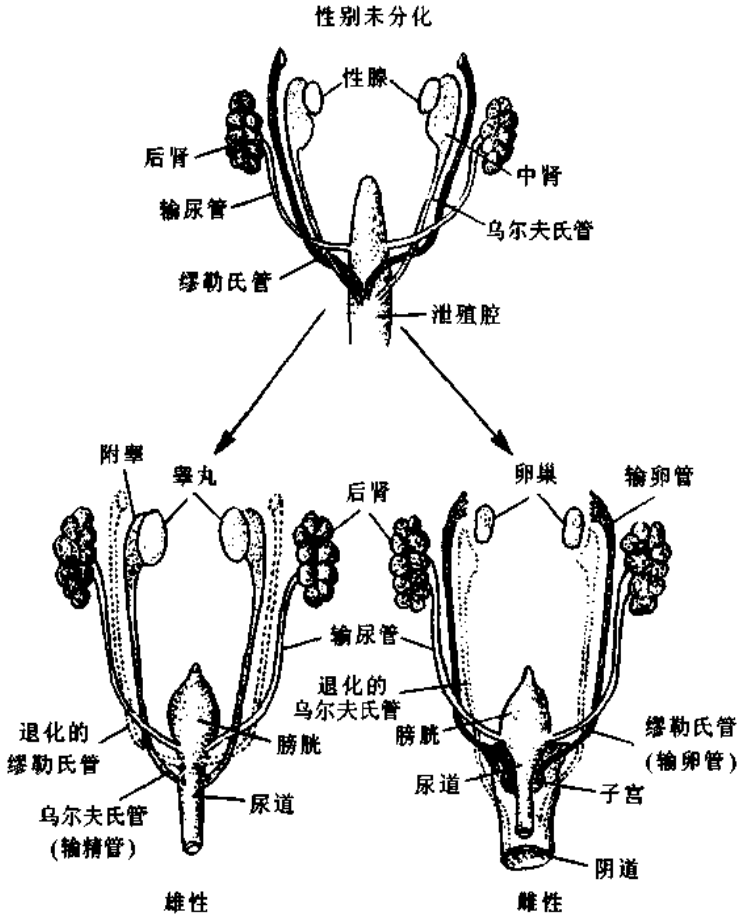


图 14.2 哺乳动物性腺及其生殖管道发育的概况

注意在未分化性腺中缪勒氏管和乌尔夫氏管二者都存在。乌尔夫氏管的区域性发育取决于它们遇到的间质。下部的乌尔夫氏管正常应形成附睾，如果它与上部(精囊)乌尔夫氏管的间质共同培养，将发育为精囊组织

第二节 哺乳动物的性别决定

一、哺乳动物染色体的性别决定

(一) 初级性别决定

初级性别决定(primary sex determination)涉及性腺的决定。哺乳动物性别决定严格地是由染色体决定,通常不受环境的影响。在大多数情况下,雌性是 XX,而雄性是 XY,每个个体至少必须具有一个 X 染色体。因为雌性是 XX,她的每个卵具有一个 X 染色体;雄性是 XY,能产生两种类型的精子,一半携带 X 染色体,另一半为 Y。如果受精卵(zygote)接受来自精子的另一个 X 染色体,产生的个体形成卵巢,为雌性;如果受精卵接受来自精子的 Y 染色体,产生的个体形成精巢,为雄性。Y 染色体携带一个基因,它编码精巢决定因子,这个因子(可能是 *SRY* 基因的产物)组织性腺发育为精巢,而非卵巢。如果精子既不含 X 染色体,也不含 Y 染色体(XO),那么此受精卵产生的个体形成纤维性(fibrous)生殖腺,它既不形成精子,也不形成卵子。因此第二个 X 或 Y 染色体对形成性腺和保持其功能是必须的。哺乳动物的 Y 染色体对其性别决定是一个关键因子,一个具有 5 个 X 染色体和 1 个 Y 染色体的人(XXXXXY)将是雄性;而只具有一个 X 染色体,而不具有第二个 X 或 Y 染色体的人发育为雌性,并开始形成卵巢,但卵巢中并不含卵泡。

(二) 次级性别决定

次级性别决定(secondary sex determination)涉及性腺之外的身体表现型。一个雄性哺乳动物具有阴茎(penis)、精囊(seminal vesicle)、前列腺(prostate)和常见性别特异的个体大小、声带软骨和肌肉系统;而雌性哺乳动物具有阴道、子宫颈、子宫、输卵管 、乳腺(mammary gland)和常有性别特异的个体大小、声带软骨和肌肉系统。上述第二性征通常是由性腺分泌的激素决定的。然而在缺少性腺的情况下,产生雌性的表现型。如将幼兔未分化前的性腺除去,结果产生的兔子都是雌性,不管它们是 XX,还是 XY。所有产生的兔子都具有输卵管、子宫和阴道,而缺少阴茎和雄性的次级结构。

哺乳动物性别决定的过程如图 14.3。如果没有 Y 染色体存在,性腺原基发育为卵巢。由卵巢产生的雌激素能使缪勒氏管发育为阴道、子宫颈、子宫和输卵管。如果 Y 染色体存在便形成精巢,它可以分泌两种主要的激素:第一种是抗缪勒氏管激素(anti-Müllerian duct hormone,AMH,通常称为抗缪勒氏激素;或 MIS,缪勒氏抑制物质),它将破坏那些形成子宫、子宫颈、输卵管和阴道上部的组织;第二种激素为睾酮,它雄性化胎儿,刺激阴茎、阴囊和雄性解剖学的其他部分的发育;同时抑制乳腺原基的发育。因此,除非由于胎儿睾丸分泌的两种激素的影响变为雄性,否则个体将具有雌性的表现型。

二、哺乳动物精巢决定的 Y 染色体基因

现已发现几个基因是正常性别决定所必须。在果蝇(*Drosophila*)和秀丽新小杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)遗传学的研究中已鉴别出大量引起性别表现型的基因。在哺乳动物中很难使用这些遗传学的方法,但在临床研究中也已鉴别出几个基因在性别决定中起作用。

在小鼠和人类,一部分 Y 染色体的存在对起始睾丸的发育是必须的,由未分化性腺分化为睾丸的路线好像是依赖于上皮生殖索细胞中 Y 染色体基因的表达,这是通过由 XX 和 XY 卵裂球制备镶嵌小鼠证明的。当这种 XX/XY 镶嵌鼠制成时,它们通常是不育的雄性。这些小鼠睾丸的睾丸间质细胞是由 XX 和 XY 细胞组成的(表明 XX 细胞能形成睾丸的结构),但支持细胞几乎全是由 XY 胚胎产生的。因此,睾丸分化中关键的事件好像是在支持细胞系中 Y 染色体性别决定基因的表达。在人类睾丸决定因子(testis - determining factor,TDF)的基因位于 Y 染色体的短臂上。一个个体出生时具有 Y 染色体的短臂,但无长臂,为雄性;而一个个体出生时具有 Y 染色体的长臂,

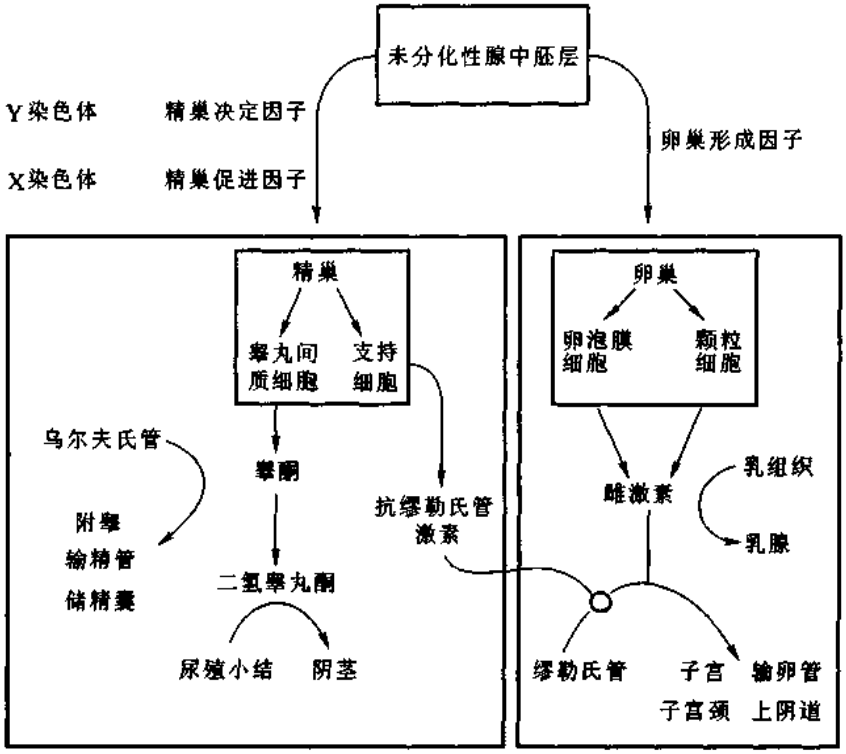


图 14.3 哺乳动物导致性别表现型形成的一系列事件

当 Y 染色体存在时,未分化性腺转变为精巢,精巢细胞分泌的激素引起身体向雄性的方向分化。在缺少 Y 染色体时,卵巢基因活动并形成卵巢,发育为雌性的表现型

但无短臂,则为雌性。从 1985 年短臂的含有 *TDF* 基因的区域已经通过临床研究结合 DNA 杂交被鉴别出来:Y 染色体特有的 DNA 通过筛选由 XY 和 XX 细胞预制备的雄性细胞产生的重组 DNA 文库中分离出来,Y 染色体特异的序列将只结合于从由 XY 细胞而不是 XX 细胞制备的 DNA。通过筛选失去部分 Y 染色体个人 Y 染色体上这种特异的 DNA 序列,则能确定 Y 染色体由此衍生出的特殊序列。在人群中存在 XX 雄性(在雄性中仅占二万分之一)和 XY 雌性两种情况。DNA 杂交的结果证明,XX 雄性在其一个染色体上具有转位的 Y 染色体 1 区中的特异的 DNA,而所有检测的 XY 雌性丢失了 Y 染色体的这个区(图 14.4)。那么更像是睾丸决定因子的基因定位于 Y 染色体的 1 区,靠近短臂的顶端。类似的,来自小鼠的证据也提示 DNA 的这个区含有 Y 染色体的睾丸决定基因。

通过分析 XX 男性和 XY 女性的 DNA,这个睾丸决定基因的位置已进一步缩小到 Y 染色体的一个 35 000 碱基对的区域,它正好位于拟常染色体末端的前面(图 14.5)。在这个区域中已发现一个男性特异的 DNA 序列,它能编码一个含有 223 个氨基酸的肽。这个肽可能是一个转录因子,因为它应含有一个称为 HMG(high mobility group)box 的 DNA 结合域,这个 HMG box 发现于几个转录因子中,它是非组蛋白的染色质蛋白质,而且它诱导与它结合的 DNA 区域发生弯曲。这个 DNA 称为 *SRY*(sex - determining region of the Y)基因,而且有证据表明它确实是人类睾丸决定因子基因。它被发现于 XY 男性和极少的 XX 男性中,而在正常的 XX 雌性以及许多 XY 雌性中缺失。在其他 XY 雌性中,发现 *SRY* 基因中具有突变的点或移码(frame shift)。迁移率移位分析证明 DNA

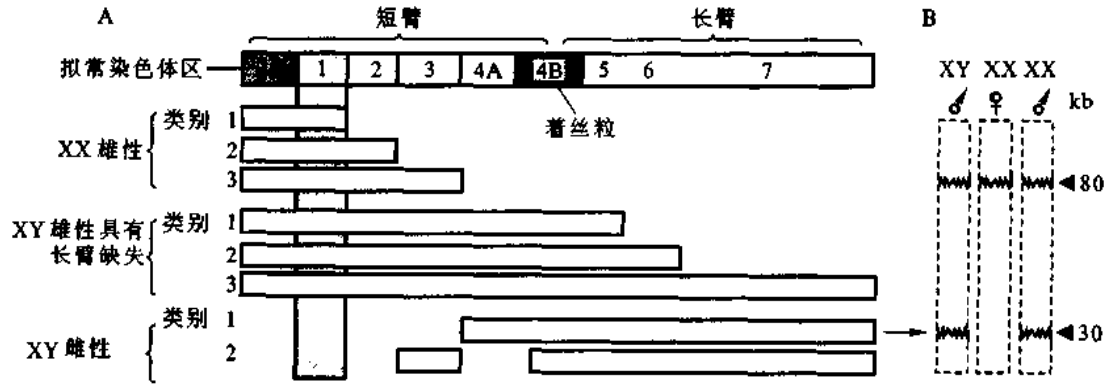


图 14.4 人类睾丸决定因子基因的缺失图谱

A. Y 染色体被分为 9 个片段，中间 4B 是着丝点，而有点的区域是"拟常染色体"部分，它含有与 X 染色体共有的 DNA 序列(这使它能在有丝分裂期间与 X 染色体配对)。XX 雄性具有来自 1 区的 DNA，而 XY 雌性的 Y 染色体失去这部分物质。由于这个区域太小难以用显微镜观察，只有用 DNA 杂交技术确定这个区存在与否，杂交的结果见图 B B. 图中具有放射活性的 DNA 来自 Y 染色体的 1 区。这个 Y 染色体特异的 DNA 认为含有 TDF，因为 Southern 印迹法的放射自显影照片证实它在 XY 男性和 XX 男性中存在，但在 XX 女性中不存在

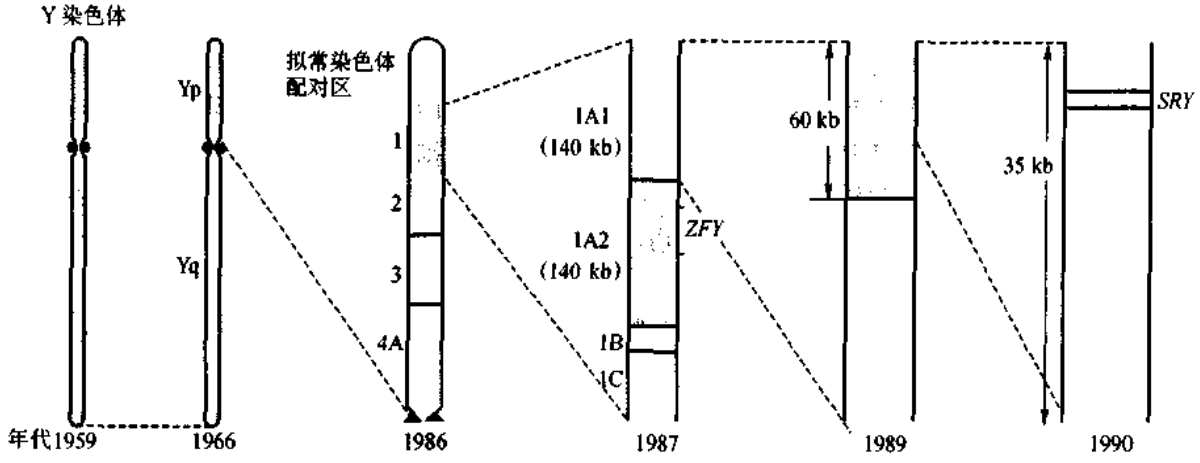


图 14.5 1959 年证明在人类和小鼠的 Y 染色体含有睾丸决定因子(TDF)；1966 年人类染色体移位和缺失表明 TDF 位于 Y 染色体的短臂(Yp)上；20 世纪 80 年代末期雄性特异 DNA 探针做的缺失图谱显示基因位于 Y 染色体小臂的 1 区，并认为 ZFY 是睾丸决定因子。在 1990 年 XX 雄性、XY 雌性和转基因小鼠的研究将 TDF 定位于 Y 染色体含 *SRY* 基因的一个区

结合活性对性别决定是重要的，而且在 *SRY* 基因中具有突变点的 XY 雌性形成一种 SRY 蛋白质，它难以与 DNA 结合。至少有两个涉及第二性征决定的基因[AMF 和 P450 芳构化酶(aromatase)的基因涉及睾酮的合成]在它们的启动子中含有 SRY 结合位点。如果 *SRY* 真的编码主要的睾丸决定因子，那么应期望它在睾丸刚分化之前或分化期间直接在生殖嵴中起作用，这一预言已在小鼠同源染色体的研究中得到证实。小鼠的这个基因(*Sry*)也与睾丸的出现有关，它存在于 XX 雄性中，而在 XY 雌性中缺失。*Sry* 基因在小鼠性腺刚分化为睾丸之前或分化期间在未分化性腺的体细胞中表达，这是在小鼠胚胎中唯一看到这个基因表达的时间和地点。*Sry* 是睾丸决定因子基因

的最有效的证据来自转基因小鼠。如果 *Sry* 对诱导睾丸形成起作用，那么将 *Sry* DNA 插入一个正常 XX 小鼠的合子将引起 XX 小鼠形成睾丸。通过实验将包括 *Sry* 基因的 DNA 中 14 000 碱基对区取下，并将这个序列显微注射到刚受精的小鼠合子的原核中。在几个例子中注射过含有 *Sry* 序列的小鼠胚胎发育出睾丸、雄性的附属器官和阴茎。但没有形成具功能的精子，这在预料之中，因为在 XXY 小鼠和男性中两个 X 染色体的存在阻止精子的形成。因此，有理由认为 *Sry*/*SRY* 是在哺乳动物 Y 染色体上主要的睾丸决定基因。

三、在精巢决定中的常染色体基因

初级性别决定是指由未分化的性腺形成精巢或卵巢。已知 Y 染色体的睾丸决定基因是性别决定所必须的，但对哺乳动物，睾丸发育还不是足够的。现在还不知道哪些基因被 Y 染色体上的睾丸决定基因调节，对小鼠的研究证明，Y 染色体基因必须与常染色体的一些基因协调。现已发现当家鼠（*Mus domesticus*）在一个特殊的近亲杂交实验小鼠品系中繁殖时，在 XY 个体中卵巢组织发育，其中一半 XY 小鼠完全性别颠倒，只具有卵巢组织作为性腺，而另一半则含有精巢和卵巢两种组织。小鼠每个品系 Y 染色体的睾丸决定基因能与它自己常染色体的睾丸决定基因（*Tda - 1*）协调，但并不需要与其他品系协调。有可能基因产物表达的时间在两个品系之间不同，这意味着如果染色体来自另外的品系时，它们并不同时存在。

另一个常染色体性别决定基因是 *T* - 相关性别颠倒（*T - associated sex reversal*，*Tas*）基因。这个基因与家鼠 17 染色体上的 *T/t* 基因复合体隔离，它不同的等位基因已发现于小鼠的不同近交系中。家鼠的 C75 和 AKP 品系二者有约 50% 的机会形成雄性。然而如果 17 染色体来自 C57 品系，那么 AKP 的 Y 染色体不能指导睾丸的形态发生。在这种情况下，正常的睾丸决定被打乱，而且每个性腺含有卵巢和睾丸组织的混合物。现在还不知道这些基因怎样与 *Sry* 基因产物相互作用。

在人类，对除Y染色体之外的染色体上睾丸决定基因的需要已被极少数XY，SRY^+女性和

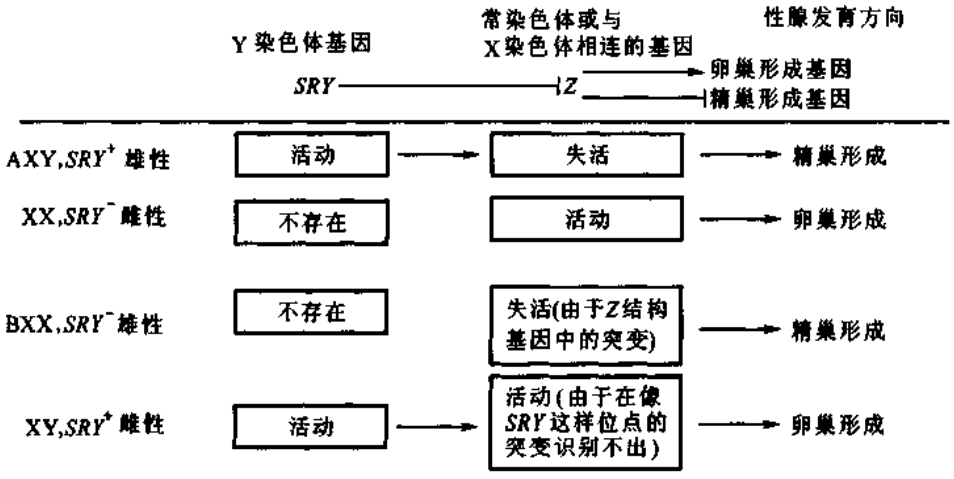


图 14.6 人类初级性别决定的假设模型（仿 McElreavey 等，1993）

SRY 基因失活，Z 基因产物表达，它的活动抑制睾丸的发育和刺激卵巢的发育

A. 野生型雄性和雌性 B. Z 基因中假定的突变将解释 XX，SRY^- 雄性和 XY，SRY^+ 雌性

XX,SRY⁻男性所证明。有人假设一个Z基因的存在,它的活动抑制睾丸的分化,而刺激卵巢形成。SRY蛋白将抑制Z基因(或它的产物),所以允许睾丸发育(图14.6A)。

在缺少SRY的XX雄性中,假设Z基因发生突变,以致没有功能产物形成。因此将产生睾丸的表现型。具有SRY的XY雌性可以解释为当Z基因(或它的产物)对SRY蛋白质的抑制作用不敏感时,那么Z基因是活动的,则卵巢的表现型将被表达(图14.6B)。应该认识到睾丸和卵巢二者的发育都是活动的过程。在哺乳动物的性别决定中,它们没有一个是处于"缺席状态"。虽然近年已取得明显的进展,但我们仍不知道睾丸或卵巢决定基因在做什么,而且性别决定的问题仍然是生物学中的一个未解决的重大问题。

四、动物的次级性别决定

(一) 性别表现型的激素调节

由初级性别决定并没有给出完全的性别表现型,次级性别决定涉及由睾丸或卵巢合成的激素引起的雄性或雌性表现型的发育。雄性和雌性二者的次级性别决定具有两个主要的时间成分:第一个发生在器官发生的胚胎期,第二个发生在成年时期。如果在胚胎期除去动物未分化的性腺,则出现雌性的表现型,缪勒氏管发育,而乌尔夫氏管衰退。这也发现于某些人中,他们出生时没有具功能的性腺,这些人的细胞只有一个X染色体(没有Y染色体),他们起初发育出卵巢,但这样的卵巢在出生前萎缩,其生殖细胞在青春期之前死亡。在来自母体或胎盘的雌激素的影响下,这些婴儿出生时具有雌性的生殖管道。

雄性表现型的形成涉及睾丸激素的分泌,这些激素促进乌尔夫氏管的发育,但引起缪勒氏管的萎缩。第一种这样的激素是抗缪勒氏管激素(anti-Müllerian duct hormone,AMH),一种支持细胞激素,引起缪勒氏管的退化。第二种这样的激素是类固醇睾丸酮,是由睾丸的间质细胞分泌的,它引起乌尔夫氏管分化为附睾、输精管和贮精囊,它还引起尿殖突起(urogenital swellings)和泄殖窦(sinus)发育为阴囊(scrotum)和阴茎。这两个独立的男性化(masculinization)系统的存在是由患雄激素不敏感综合征(androgen insensitivity syndrome)病人证实的,这些XY的个体具有睾丸决定因子基因,所以具有睾丸并能分泌睾酮和AMH。然而这些人缺少睾酮受体蛋白,因此不能对睾丸形成的睾酮起反应。但能对肾上腺形成的雌激素起反应,所以他们的外表明显的是雌性。然而除去雌性外表之外,这些个体具有睾丸,尽管不能对睾酮起反应,但能对AMH起反应,因此缪勒氏管退化。这样的人发育像正常的女性,但是不育的,他们缺少子宫和输卵管。因此存在两种明显不同的男性化激素,睾酮和AMH。虽然睾酮可能在一定的组织中不是活动的激素,在1974年就证明睾酮在泄殖窦和隆起中被转变为5α-二氢睾酮,但在乌尔夫氏管中并不转变。在多明尼哥共和国的一个地区的居民中有几个具有5α-酮类固醇还原酶(5α-ketosteroid reductase)的遗传缺失,受影响个体缺少这种酶有功能的基因。虽然这些XY个体具有功能性睾丸,也具有阴道盲囊(blind vaginal pounch)和一个增大的阴蒂(clitoris),看起来像姑娘,而且像姑娘一样长大,但内部解剖是雄性:具有睾丸,乌尔夫氏管发育,缪勒氏管退化。显然外生殖器(external genitalia)的形成是受二氢睾酮控制的,而乌尔夫氏管的分化是受睾酮本身控制的。极有趣的是在青春期外生殖器变得对睾酮起反应,能在起初被认为是女孩的人身上引起明显的男性化。抗缪勒氏管激素(AMH)是在支持细胞中形成的560个氨基酸的糖蛋白,当胎儿睾丸的碎片或分离的间质细胞被置于培养的部分乌尔夫氏管和缪勒氏管的碎片附近时,即使乌尔夫氏管不发生变化,但缪勒氏管萎缩。这种萎缩是由细

胞的死亡和管的上皮细胞变为间质细胞及迁移出去引起的。乌尔夫氏管对这种激素的作用只在一个短暂时期是敏感的(图 14.7),而睾丸只在出生时或接近出生时停止产生这个因子。小鼠的 *AMH* 基因具有一个结合 Sry 蛋白质的启动子序列,所以好像是 Sry 直接激活 *AMH* 基因的转录。

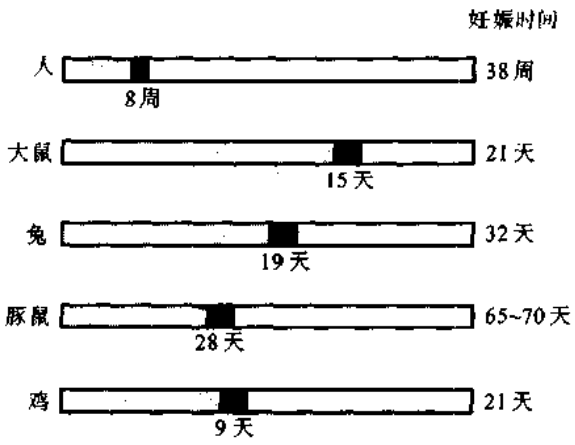


图 14.7 缪勒氏管对 AMH 的敏感性

点区代表未分化性腺时期,黑色区代表缪勒氏管对 AMH 起反应的时期

因此一旦睾丸形成,它合成两种引起胎儿男性化的激素,其中睾酮能被形成外生殖器的组织转变成一种较活跃的形式。在雌性由胎儿卵巢分泌的雌激素好像足以诱导缪勒氏管分化为子宫、输卵管和子宫颈。在这样的一种模式中,性染色体控制个体的性别表现型。

(二) 中枢神经系统

次级性别决定的一个最有争议的领域涉及性别特异行为的发育。在鸣禽中睾酮被认为负责调节脑中雄性特异的神经元簇生长。雄的金丝雀和斑胸草雀鸣声意味深长,而雌鸟很少鸣叫。这些鸣声用于标记领地和吸引交配。鸣叫的能力是受其脑中 6 个不同的神经元簇(核团)控制的(图 14.8),神经元将这些区域的每一个彼此连接。在雄金丝雀中这些核团比在雌金丝雀中对应的神经元簇大几倍。在雌性斑胸草雀可能完全缺少其中的一个区。睾酮在产生鸣声中起主要作用,在成年雄斑胸草雀中已证实鸣声的数量与血清中睾酮的浓度之间存在一种线性关系。已证明睾酮水平的季节变化与这些鸟季节鸣叫模式相关。当睾酮处于低水平时,不仅鸟的鸣声减少,而且雄性特异的脑核团的大小也减少。成年的斑胸草雀在阉割后鸣声消失。11 月份这种鸟正常并不鸣叫,但在 11 月份注射睾酮可以诱导这种鸟鸣叫。在几种鸟中发现,雌鸟也可通过注射睾酮诱导发声鸣叫。脑中 4 个控制鸣叫的区域在这些鸟中长大 50%~69%,而其他区域并不显示这样的生长。放射自显影的研究证明控制鸣叫核团的神经元掺入放射性睾酮,而脑的其他区域不掺入。那么显然性激素能在产生性别特异行为的神经系统的区域发育中起主要作用。

这种情况在哺乳动物中并不如此清楚,因为较少行为是一个性别所独有的。大鼠阴茎的挺伸是这样一种行为,它是受神经支配到提肛肌(levator ani)和球海绵体肌(bulbocavernosus)的运动神经元控制的,所有这些神经元起源于脊髓的核团,这些核团特异的聚集睾酮。在雌性大鼠中这些肌肉发育不全,而且控制神经元的数量大大减少。睾酮好像在这些起反应的神经元中引起两类变化:在胎儿和新生大鼠中睾酮可以防止这个区域中神经元"正常"发生的死亡;雌性大鼠失去这个脊髓核团中高达 70%的神经元,而雄性大鼠仅失去 25%。在成年大鼠中睾酮作用于这个核团使其保持神经元和它们树突的大小。当成年大鼠被阉割后,此脊髓核团的核体区和树突的长度减少一半,这种减少可通过注射睾酮复原。

睾酮不是唯一的能调节行为的类固醇。在哺乳动物的脑中也发现对雌激素敏感的神经元,这些神经元位于神经元回路的位置(图 14.9),已知它们可调节生殖行为,其中包括下丘脑、垂体和扁桃体。研究证明雌激素改变那些下丘脑神经元电的和化学的特性,使其染色质能结合雌激素。以

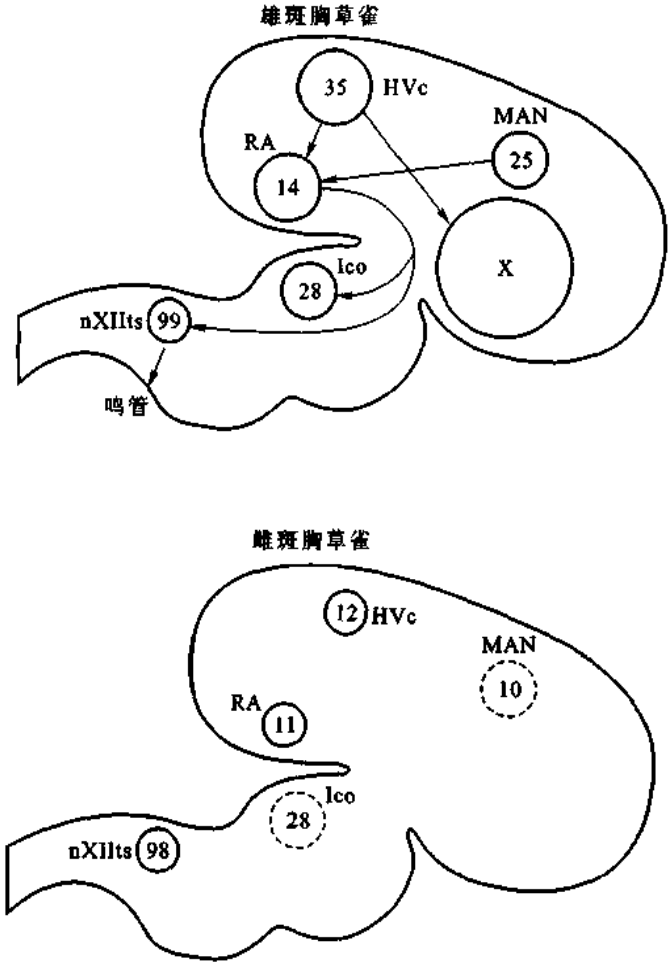


图 14.8　在鸟脑中性别的二态性

图示在斑胸草雀中认为控制鸣叫的主要神经元区。圆圈代表特异的脑区，每个圆圈的大小与此区占据的面积成比例。虚线圆圈代表估计的大小，每个圆中的数字代表掺入放射性标记睾酮细胞的百分数。在三个区域(HVc，RA 和 nXIIts)中性别间数量的不同是明显的，X 区在雌性斑胸草雀中尚未看到。在 HVc 和 MAN 区中与睾酮的结合明显不同，在其他区域中尚未发现类固醇激素结合的性别差异。箭头表示在雄性斑胸草雀脑中轴突连接不同区域的路径

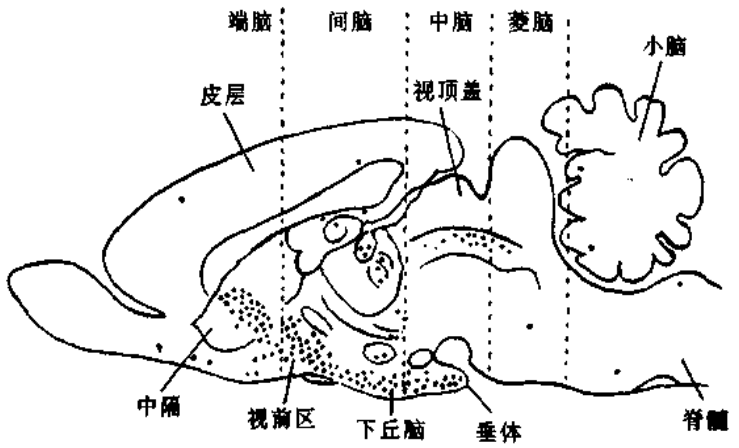


图 14.9　在雌性大鼠脑中结合雌激素的区域

前的研究发现这些神经元的电活动随大鼠的季节雌激素周期发生变化，在排卵期升高。另外，雌激素在这些区域能刺激那些诱导雌性生殖行为的神经元。切除卵巢的大鼠直接向下丘脑注射雌激素显示脊柱前突(lordosis)，这种姿势刺激雄鼠与它交配，而对照的切除卵巢大鼠并不显示这种行为。雌激素在这些时间引起特异神经元活动的机制认为涉及这些神经元钾离子的通透性增加。

第三节 果蝇的性别决定

一、果蝇中染色体性别决定

哺乳动物和昆虫(如果蝇)都用性别决定的 XX/XY 系统，但它们的机制非常不同。在哺乳动物 Y 染色体在雄性决定中起关键作用，因此 XO 哺乳动物为雌性，具有卵巢、子宫和输卵管(但极少有卵细胞)。在果蝇中性别决定是通过平衡 X 染色体上的雌性决定因子和常染色体(非性染色体)上的雄性决定因子实现的。如果在二倍体的细胞(1X:2A)中只有一个 X 染色体为雄性；如果在二倍体细胞(2X:2A)中存在两个 X 染色体则为雌性。因此 XO 果蝇是不育的雄性。表 19.1 显示不同 X 染色体与常染色体比率产生的不同性别。

表 19.1：果蝇(*Drosophila melanogaster*)在不同性表现型中 X 染色体与常染色体的比率

X 染色体数	常染色体(A)	X:A 比率	性 别
3	2	1.50	超雌
4	3	1.33	超雌
4	4	1.00	正常雌性
3	3	1.00	正常雌性
2	2	1.00	正常雌性
2	3	0.66	中性
1	2	0.50	正常雄性
1	3	0.33	超雄

(引自 Strickberger, 1968)

通常在果蝇和昆虫中可以看到雌雄嵌合体(gynandromorphs)，这种动物中一些区域是雄性，而其他区域为雌性(图 14.10)，当一个 X 染色体从胚胎的一个细胞核中失去后能产生这种现象。这个细胞核的后代不再是 XX(雌性)，而是 XO(雄性)。因为在昆虫中没有性激素来调节这样的事件，每个细胞自己进行性别"决定"。XO 细胞显示雄性的特征，而 XX 细胞显示雌性的特性。这种情况成为 X 染色体和性别之间相关的极好例证，从这个例子可以看出在果蝇性别决定中，Y 染色体一点也不起作用，它只对保证雄性的生殖能力是必须的。Y 染色体只在发育晚期精子形成期间是有活性的。

有关果蝇性别决定的理论必须解释 X 染色体与常染色体的比率是怎样辨认的，这个信息是怎样传送到控制雄性或雌性表现型基因的。虽然还不知道 X:A 形成的内在机制，但最近几年的研究已改变了关于果蝇性别决定的观点。许多研究已考虑到识别和分析那些对性别决定必须的基因，以及将这些基因置于发育的顺序中。大多数这些基因丧失功能的突变体——性别－致死基因(*sex－lethal*，*Sxl*)、性别转换基因(*transfomer*，*tra*)和性别转换基因－2(*tra－2*)将 XX 个体转变

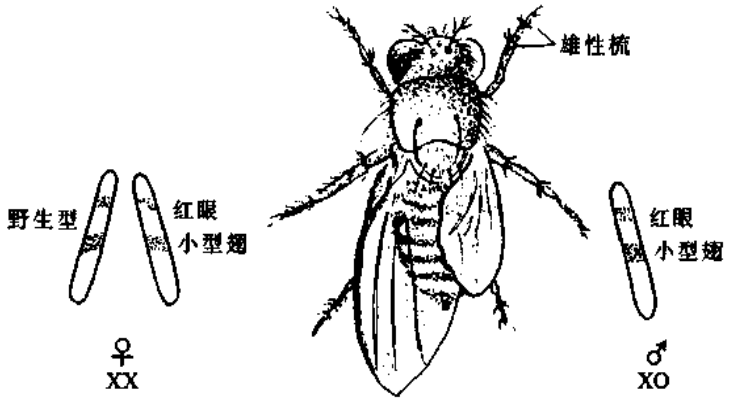


图 14.10　果蝇的雌雄嵌合体，其左侧为雌性(XX)，而右侧为雄性(XO)

雄性一侧失去了携带眼颜色和翅形状野生型同位基因的一条 X 染色体，所以在剩余染色体上隐性同位基因红眼和小翅得以表达

为雄性，而这样的突变体对雄性的性别决定没有影响。中性基因(*intersex*，*ix*)纯合子引起 XX 果蝇发育为中性表现型，在同一器官中具有部分雄性和雌性的组织。双性基因(*doublesex*，*dsx*)对两性的性别决定是重要的。纯合的隐性 *dsx* 等位基因将转变 XX 和 XY 果蝇为中性。

这些基因在发育过程中的位置是根据：①在果蝇中产生携带两个或更多突变遗传杂交的说明，②确定当完全缺少这些基因中一个的产物时发生什么现象。这样的研究已产生如图 14.11 所示的级联模型。

二、作为性别决定中枢的性别——致死基因

(一) 对 X:A 比率的解释

果蝇性别决定的第一期涉及辨认 X:A 比率，X 染色体上的什么成分"记数统计"和怎样利用这个信息？似乎高水平的 X:A 比率负责激活雌性化开关基因(feminizing switch gene)和性别－致死基因(*sex－lethal* gene，*Sxl*)。在低水平(雄性)*Sxl* 基因在发育早期保持失活。在 XX 果蝇中 *Sxl* 在受精后前 2 小时被激活，这个基因转录一个特殊胚胎类型的 *Sxl* 的 mRNA，它只存在 2 小时多。一旦 *Sxl* 被激活，不论 X:A 比率的任何变化它将继续存在。早期 *Sxl* 的功能对 XX 胚胎起始雌性的发育途径和保持从两个 X 染色体合适水平的转录是必须的。在那些 XX 个体中 *Sxl* 是无功能的，产生雄性表现型，X 染色体转录更快(正如正常雄性胚胎中单个 X 染色体必须产生像正常雌性两个 X 染色体产生的那样多的基因产物)。在 XX 胚胎中这种 X 染色体转录的过度刺激(overstimulation)是致死的。

Sxl 基因这种雌性特异的转录被认为是受 X 染色体上的"计数器"成分刺激的，它组成 X:A 比率的"X"部分。现已证实两个这样的计数器是 X 染色体基因：无姊妹－*a*(*sisterless－a*，*sis－a*)和无姊妹－*b*(*sisterless－b*，*sis－b*)。研究发现果蝇变种的常染色体中有两个 X 染色体区域插入。如果它在雄性存在，则是致死的，因为接收这个染色体的雄性激活它们的 *Sxl* 基因，因为它们继承了两个 X 染色体。激活的 *Sxl* 基因引起 X 染色体的剂量补偿，成为雌性(即具有较少的转录)，但是如果雄性只具有一个 X 染色体，将证明是致死的。用此鉴定计数器基因发现了 *sis－a* 和 *sis－b* 基因。具有这些基因的两个副本证明对 XY 胚胎是致死的，而每个 *sis* 位点上，一个副本的同时缺

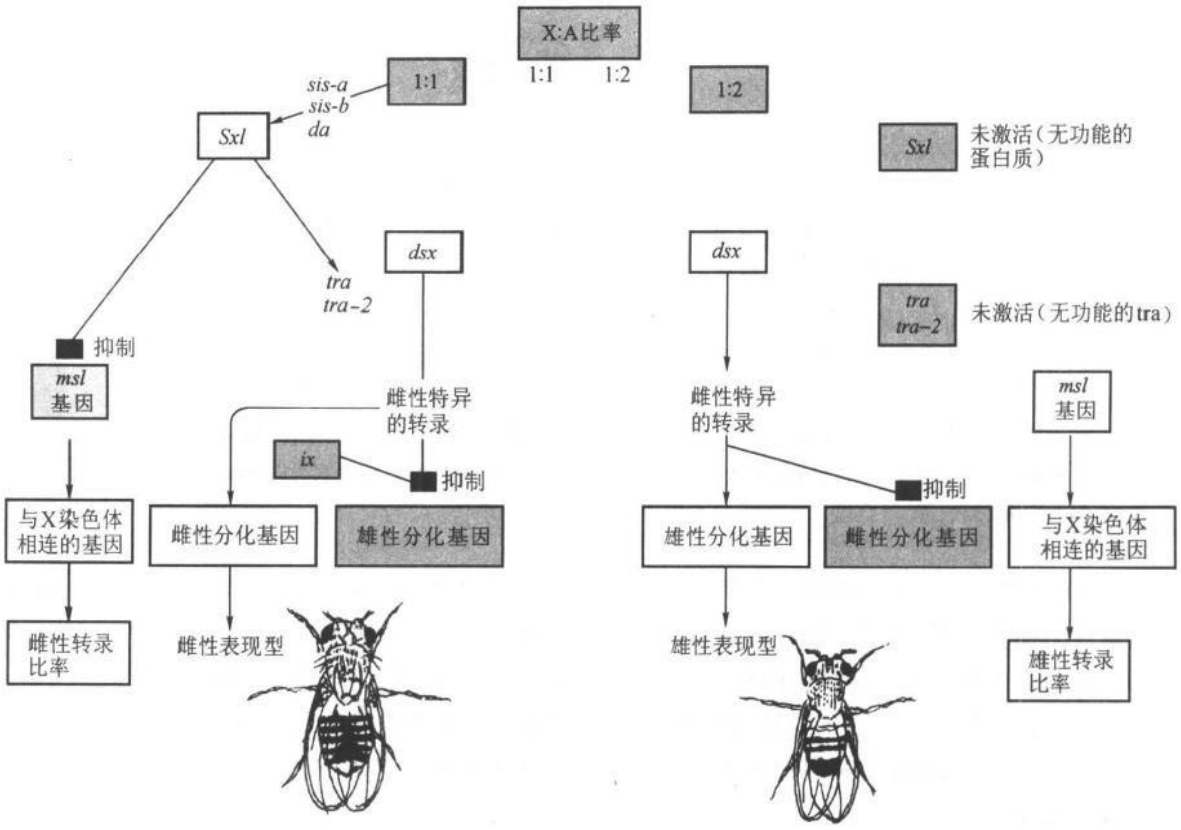


图 14.11 果蝇嵌合性别决定中假设的调节级联(仿 Backer 等,1987)

箭头代表激活;线条末端的方块代表抑制。在 *sxl* 基因的控制下 *msl* 基因位点调节雌性 X 染色体的剂量补偿转录

失证明对雌性是致死的(因为即使它们的胚胎是 XX,它们的胚胎并不激活 *Sxl* 基因)。所以每个 *sis* 基因两个副本的存在与具有两个 X 染色体的副本是相等的。*sis* 基因可能不仅是计数器成分,研究证明野生型雄性果蝇的遗传背景对这些基因的双倍剂量是不敏感的。

Sxl 基因在没有矮小(*runt*)和无女(*daughterless*;*da*)基因产物存在时并不像计数器成分的情况。缺少 da 蛋白质阻止 *Sxl* 基因激活。这并不影响 XY 胚胎(因为它们并不激活 *Sxl*),但它在雌性胚胎中是致死的,因为剂量补偿的机制引起两个 X 染色体以较快速率转录,正如其突变体的名字所指。因此在受精后不久 *sis* - *a*、*sis* - *b*、*runt* 和 *da* 基因使 *Sxl* 只在雌性胚胎中在转录上是活跃的。

"分母成分"(denominator elements)是那些从常染色体得到计数的基因。一个主要的分母成分好像是无表情(*deadpan*)基因。具有太高的 *sis* - *b* 与无表情基因比率的雄性激活 *Sxl* 并死亡,而具有太低的 *sis* - *b* 与无表情比率的雌性不激活 *Sxl* 并死亡。无女、*sis* - *a*、*sis* - *b* 和无表情基因都是螺旋 - 环 - 螺旋(HLH)转录因子,而且可能分母和计数器成分来自彼此的杂二聚体(heterodimer)。假设分母蛋白质能形成杂二聚体,它阻断活动因子(*sis* 和 *daughterless*)蛋白质(图 14.12)。

(二) 维持 *Sxl* 的功能

在这样的转录发生后不久,性别 - 致死基因上的第二个启动子被激活,而且这个基因在雄性和

雌性二者中都转录。然而由 *Sxl* mRNA 制备的 cDNA 分析显示雄性小鼠的 *Sxl* mRNA 不同于雌性小鼠的 *Sxl* mRNA。这是不同 RNA 加工的结果。另外，Sxl 蛋白质好像是结合自己的 mRNA 前体，并以雌性的方式拼接。因为雄性不含任何可得到的 Sxl 蛋白质，它们新的 *Sxl* 转录本是以雄性的方式加工的。雄性的 *Sxl* mRNA 是没有功能的。雌性特异的 *Sxl* 信使编码 354 个氨基酸的一种蛋白质，而雄性特异的 *Sxl* 转录本在 48 个氨基酸后面含有一个翻译终止密码(UGA)。将这个终止密码放入雄性特异的 mRNA 的不同 mRNA 加工过程见图 14.12B 和 14.13。在雄性细胞核的转录本剪接成三个外显子(exon)，终止密码在中央外显子中。在雌性 RNA 加工只产生两个外显子，而雄性特异的中央外显子现在被剪接掉，作为一个大的内含子(intron)。因此，雌性特异的 mRNA 缺少终止密码。

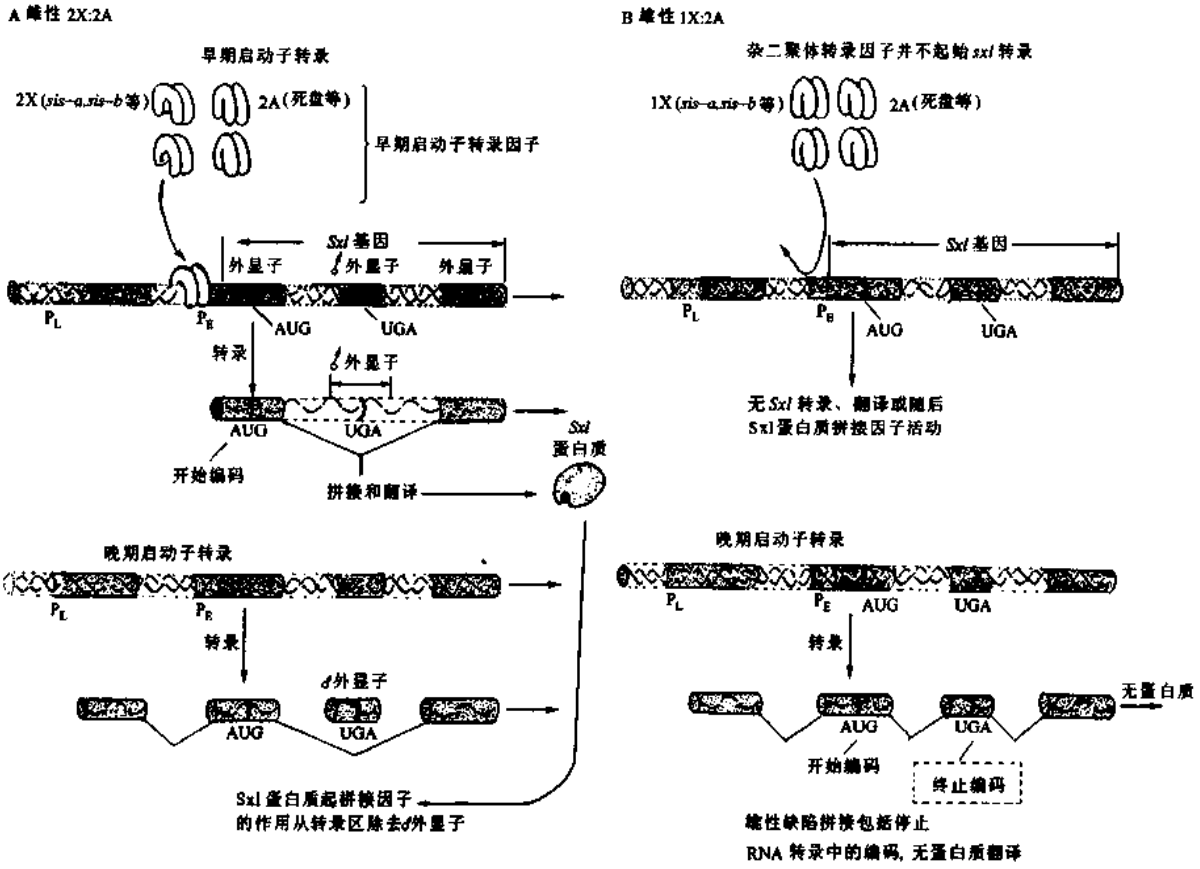


图 14.12　雄性和雌性 *Sxl* 基因不同的激活(仿 Keyes 等，1992)

A. 在具有两个 X 染色体和两套常染色体(XX、AA)的野生型果蝇中，计数器转录因子亚单位(*sis－a*、*sis－b* 等)并不完全被来自常染色体基因(如无表情)的抑制因子亚单位络合(complexed)，这些计数器因子激活 *Sxl* 基因早期的启动子，它产生一个转录本被自动拼接到编码有功能的 Sxl 蛋白质的雌性特异的 mRNA 中。最后 *Sxl* 主要的转录由晚期的启动子开始。如果 *Sxl* 很容易得到(由早期的转录)，*Sxl* 的前－mRNA被拼接形成功能性的，雌性特异的信使　B. 在具有一个 X 染色体和两套常染色体(XY;AA)的野生型果蝇中，计数器转录因子被分母亚单位结合，不能激活早期的启动子。当 *Sxl* 基因由晚期启动子转录时，RNA 拼接并不排除 mRNA 中雄性特异的外显子。产生的信使编码一个截短和无功能的多肽，因为雄性特异的外显子含有一个翻译终止密码

由雌性特异的 *Sxl* 转录本产生的蛋白质可从它的核苷酸序列预测，这个蛋白质将含两个区域，它们对结合 RNA 是重要的。有人假设被 *Sxl* 编码的 RNA 结合蛋白质有两个靶区，一个是 *Sxl* 的前－mRNA，这应是在起始激活事件发生后保持雌性路径的机制，第二个靶区是发育路径中下一个基因，性别转换基因。

三、性别转换基因

Sxl 基因通过控制性别转换基因转录本的加工调节体细胞的性别决定。性别转换基因（*tra*）可选择地拼接于雄性或雌性。存在一种雌性特异的 mRNA，还在雌性和雄性中发现一种非特异的 mRNA。像雄性的 *Sxl* 信使一样，非特异的 *tra* mRNA 含有一个早期信使的终止密码，使蛋白质成为无功能的。在 *tra* 基因中，非特异 mRNA 的第二个外显子具有终止密码。这个外显子在雌性特异信使中并不被利用（图 14.13）。雌性怎样形成与雄性不同的转录本？有人认为由 *Sxl* 基因形成的雌性特异的蛋白质在性别转换基因的前－mRNA 中的雌性特异的 3′拼接位点，引起它们的加工以拼接除去第二个外显子。为此 Sxl 蛋白质通过特异地结合于靠近它的多聚嘧啶束以阻断 U2AF 与非特异的拼接位点的结合，这引起 U2AF 结合于低吸引力（雌性特异的）3′拼接位点，并产生一个雌性特异的 mRNA。由这个信使编码的蛋白质在雌性的性别决定中是至关重要的。如果雌性特异的转录本在 XY 果蝇中人工地产生，这些果蝇变为雌性。非特异的转录本对雄性或雌性二者都没有影响。

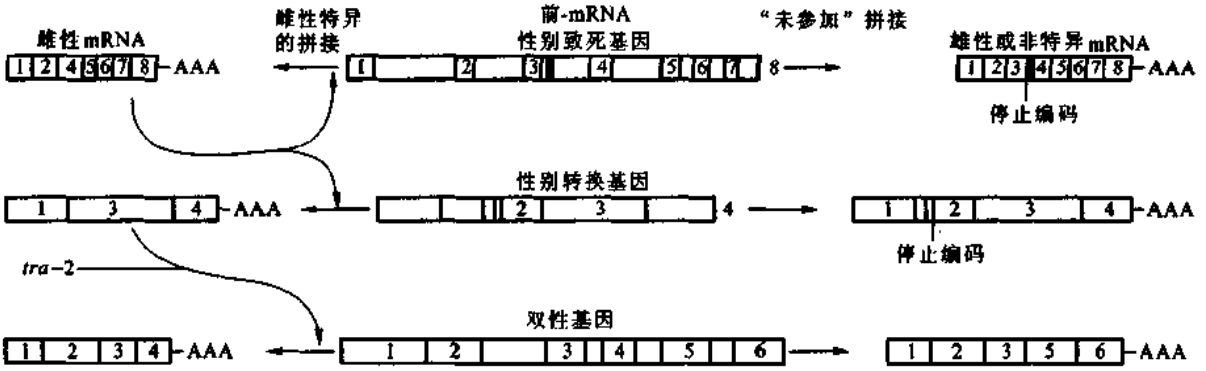


图 14.13 在果蝇三个主要的性别决定基因中性别特异的 RNA 拼接模式（仿 Baker，1989）

前－mRNA 位于图的中央，而且在雄性和雌性中是完全相同的。在每种情况下雌性特异的转录本如图左侧，而欠缺的转录本（或雄性的或非特异的）如图右侧。外显子用数字表示，终止密码和 poly(A)的位置已标出

雌性特异的 *tra* 产物与 *tra*－2 协作帮助产生雌性表现型。*tra*－2 基因对雄性的性别决定并不是必须的，但它在发育晚期对精子发生是必须的。*tra*－2 基因基本上是有活力的，而且在雄性和雌性中形成相同的蛋白质产物。这个 tra－2 蛋白质像雌性特异的 Sxl 蛋白质一样含有一个 RNA 结合域。有人假设 *tra*－2 基因能结合于双性基因的转录本，但只有在雌性特异的 tra 蛋白质存在的情况下。

四、性别决定的开关基因——双性基因

双性基因在雄性和雌性中都是有活力的，但它的初级转录本是以性别特异的方式加工的。雄性和雌性的转录本的前三个外显子是完全相同的。雌性特异转录本的一个外显子是雄性特异的信使中不翻译的3′末端。另外，显性 *dsx* 突变体的分子分析发现它们是雌性特异的外显子中的插入成分。如果一个显性的 *dsx* 等位基因存在于XX个体中，则果蝇变为雄性。

选择的RNA加工好像是性别转换基因的结果（图14.13）。tra－2和雌性特异的tra－1蛋白质特异地结合于靠近 *dsx* 前－mRNA雌性特异的3′拼接位点一个DNA序列，它们给这个位点加入非特异的拼接因子。如果不产生 *tra*，双性基因转录本以雄性特异的方式拼接。利用下游的3′拼接位点，形成雄性特异的转录本，编码一种活性蛋白质，它抑制雌性的特征，促进雄性的特性。换句话说，如果性别转换基因产生有活性的，雌性特异的蛋白质，则完成不同类型的加工。性别转换基因蛋白质结合于雌性特异的外显子内的序列，并激活雌性特异的3′拼接位点（这种选择将阻断雄性特异的3′结合位点）。另外一个不用的雌性特异3′结合位点的这种激活产生一个编码雌性特异的转录本的mRNA，它抑制雄性的发育。

双性基因蛋白质的功能可在果蝇生殖器的形成中看到。果蝇雄性和雌性的生殖器来自分离的细胞群。在雄性（XY）果蝇中，雌性的原基被抑制，雄性的原基分化为成体的生殖结构。在雌性（XX）果蝇中，雄性的原基被抑制，而雌性的原基分化。如果缺少双性基因（因此没有一个转录本形成）雄性和雌性原基都发育，产生中性的生殖器。所以性别特异的双性基因转录本的一个作用是积极地抑制不合适生殖器的发育。雄性的 *dsx* 转录本抑制雄性发育。根据这种模型，性别决定的级联至什么类型的mRNA将由双性基因转录本加工。如果X:A比率是1，那么 *Sxl* 产生一个雌性特异的拼接因子，它引起 *tra* 转录本已雌性特异的方式拼接。这种雌性特异的蛋白质与 *tra－2* 拼接因子相互作用，引起双性基因前－mRNA以雌性特异的方式拼接。如果双性基因转录本不以这种方式起作用，它将以“缺失”的方式被加工，形成雄性特异的信使。

五、性别决定级联的靶基因

果蝇中有大量蛋白质存在于一种性别而不在另一种性别，这包括卵黄蛋白和卵壳蛋白（绒毛膜）。在雄性腿的性别梳（sex combs）是性别特异的结构。研究证明，雄性和雌性的双性基因转录本二者都结合于卵黄蛋白基因的127个碱基对中增强子的三个位点。它们的结合和突变体形成的研究证明，雄性特异的双性基因产物通过它与这些位点的结合阻止转录，而雌性特异的双性基因蛋白质激活从相同位点的基因转录。除抑制雌性特异的基因产物和器官外，雄性双性基因蛋白质可能也在促进雄性性别梳的分化中具有积极的作用。

性别决定基因温度敏感的突变体使研究能确定某些靶基因对性别决定开关基因敏感的关键时间。当 *tra－2* 基因的温度敏感（*temperature－sensitive*，*ts*）的等位基因（alleles）被利用时，证明果蝇性别发育的途径从晚幼虫到成体时期是有活性的。*tra－2*^{ts}基因是一种温度敏感的等位基因，其中雌性表现型在许可温度（较冷）被抑制，而雄性表现型在不许可温度（较暖）被抑制。在最后的幼虫期和蛹期，由许可温度升高到不许可温度引起XX幼虫或蛹发育为雄性。另外，当成年突变体被保持于低温时，成体的脂肪体（fat body）产生卵黄蛋白，它将进入卵母细胞。当温度改变达到较高的不许可的温度时，卵黄蛋白基因的转录停止。一个值得注意的发现是，如果成体XX *tra－2*^{ts}

果蝇维持在不许可温度下几天，它们开始抑制雄性的求偶(courtship)行为。

第四节 雌雄同体

一、线虫的雌雄同体

秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*)具有两种性别类型，雌雄同体(hermaphroditism)和雄性。这个种的大多数个体是雌雄同体，具有精巢和卵巢。在幼虫时，这些雌雄同体产生精子，贮存于线虫的生殖道(genital tract)中(图 14.14)。成体的卵巢产生卵子，当迁移到子宫时，卵子成为受精的(因为精子早已存在于雌雄同体的成虫中)。自体受精(self-fertilization)几乎总是产生更多的雌雄同体，只有 0.2% 的后代是雄性。然而这些雄性能与雌雄同体的交配。另外，因为它们的精子具有超过内生雌雄同体精子的竞争优越性，由交配产生的性别比率是大约 50% 的雌雄同体和 50% 的雄性。

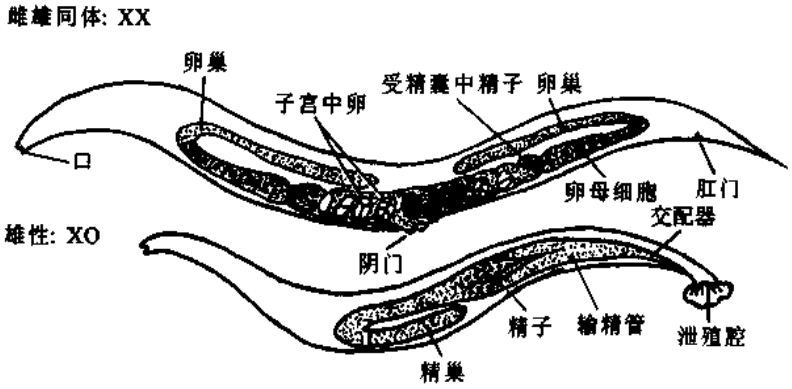


图 14.14 雌雄同体和雄性的线虫(*C. elegans*)
黑点区显示生殖系统

在秀丽线虫中雌雄同体是 XX，而雄性是 XO。像在果蝇中一样，性别决定是由 X 染色体与常染色体的比率决定的。线虫在亲缘关系接近的种之间发现 XX 雌性，表明雌雄同体是由雌性进化来的。在身体上雌性和雌雄同体的线虫是完全相同的，仅有的不同是雌雄同体的线虫在其发育早期转变为产卵之前产生精子。在秀丽线虫中甚至存在一个显性的突变体($tra-1^D$)，它将 XX 或 XO 的个体成为雌性。在具有这种等位基因的群体中，可能有三个基因是有功能的。像在果蝇中一样，线虫的性别决定涉及常染色体的一些基因，它们识别 X:A 比率并对其起反应。其中一些(*tra* 基因)对雌雄同体发育是必须的，而另一些(*her* 和 *fem* 基因)对雄性表现型的表达是必须的。纯合突变体的 *tra* 基因将 XX 个体转变为雄性，而突变体 *her* 和 *fem* 等位基因将雄性转变为雌雄同体。通过创造携带这些突变的不同结合，能创造这种发育途径的模式(图 14.15)，如 *tra* 突变体总是抑制 *her-1* 突变体，表明 *her-1* 在此发育途径中出现较早。在此途径中对性别决定关键的基因好像是 *tra-1*。如果野生型的 *tra-1* 基因是活动的，个体是雌雄同体。如果 *tra-1* 没有功

能,则个体为雄性。其他的基因好像是调节这个开关基因。在此发育途径中首先了解的基因是 *xol－1*(XO－致死),它能关闭雌雄同体发育的途径,因此将动物转变为雄性。明显的是,这是通过抑制 *sdc* 基因完成的。它的活动对激活 *tra－1* 和使动物成为雌雄同体是必须的。*sdc－1* 和 *sdc－2* 基因可能与果蝇的 *sxl* 基因是同功的,在果蝇中这些基因是与 X 染色体相连的,并影响性别决定和 X 染色体的剂量补偿二者。现已假设 *sdc* 基因产物抑制 XX 动物中 *her－1* 的活动。当 *her－1* 的活性高时,*tra－2* 和 *tra－3* 的活性低。这种活性的组合被认为是允许 *fem* 基因的表达,它关闭 *tra－1*。在 *tra－1* 产物低水平时,秀丽新小杆线虫的体细胞变为雄性的。相反,如果 *her－1* 活性是低的,*tra－1* 活性是高的,着导致雌雄同体发育模式。

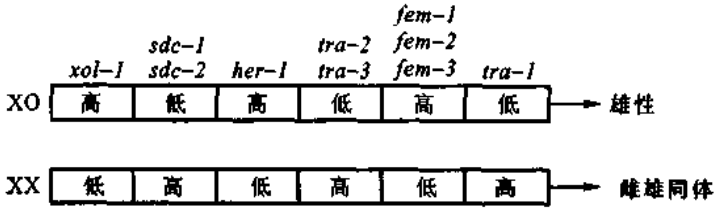


图 14.15 秀丽新小杆线虫中体细胞性别决定的模型(仿 Hodgkin,1985;Miller 等,1988)

sdc－1 基因被假设涉及转变 X/O 比率,它控制 X 染色体的剂量补偿作用,也在比率为 1 时抑制 *her－1* 基因。高低代表功能基因的活动。*sdc* 基因活动导致 *tra－1* 基因的活动,它的活动启动雌雄同体表现型。*sdc* 基因能被 *sxl* 基因抑制,只在 XO(雄性)中是活动的

但是这种线性的遗传途径与实际导致性别决定的事件是如何进行的?最近的研究表明这些基因可能编码细胞间信号途径的蛋白质。遗传嵌合体的分析提示,*sdc－1* 和 *her－1* 在产生它们的细胞中并非必须是活动的。相反,这些基因好像是形成分泌产物。对比而言,*tra－1* 以细胞自主的方式起作用,所以好像是部分信号接收器。*tra－1* 基因的顺序提示它编码一个锌指转录因子。最近又提出一种模式,它综合了这个遗传途径和性别决定的细胞生物学。her－1 蛋白质被认为在 XO 线虫中通过抑制 *tra－2* 启动雄性发育。然而 *tra－2* 基因产物并不是一个转录因子或信号因子,它是具有多个跨膜区的整合膜蛋白(integral membrane protein)。另外,它的 mRNA 以不同的数量存在于雄性和雌性中。根据这个特殊的模式(图 14.16),fem 蛋白质被结合产生一个大的 fem 蛋白质复合体,这个复合体又被 tra－2 膜蛋白连接。在 XX 个体中,fem 蛋白质复合体一直结合于膜上,而 tra－1 蛋白质能进入核内。然而在 XO 的线虫中,her－1 蛋白质结合于 tra－2 蛋白质的细胞外区域,引起 tra－2 蛋白质离开 fem 复合体。这个 fem 复合体一旦游离于细胞质中能结合 tra－1蛋白质,并防止它进入核内。因为 tra－1 蛋白质(一种假定的转录因子)不能进入细胞核,就不能激活雌雄同体特异的基因。现在需要进行更多的研究确证和反证这个模式,但它对提出新的研究和了解基因可能怎样产生线虫的性别决定的途径。

二、鱼类中的雌雄同体

秀丽线虫最有趣的问题之一是它的雌雄同体。这种情况怎么可能在一个具有雌雄性别系统的机体中产生呢?哪些基因发生变化?是否存在能被利用的其他解决办法?线虫(*C. ramanei*;具有雄性和雌性的个体)亲缘关系接近种的性别决定基因现在已经鉴别出来,所以这样的问题可能被回答。

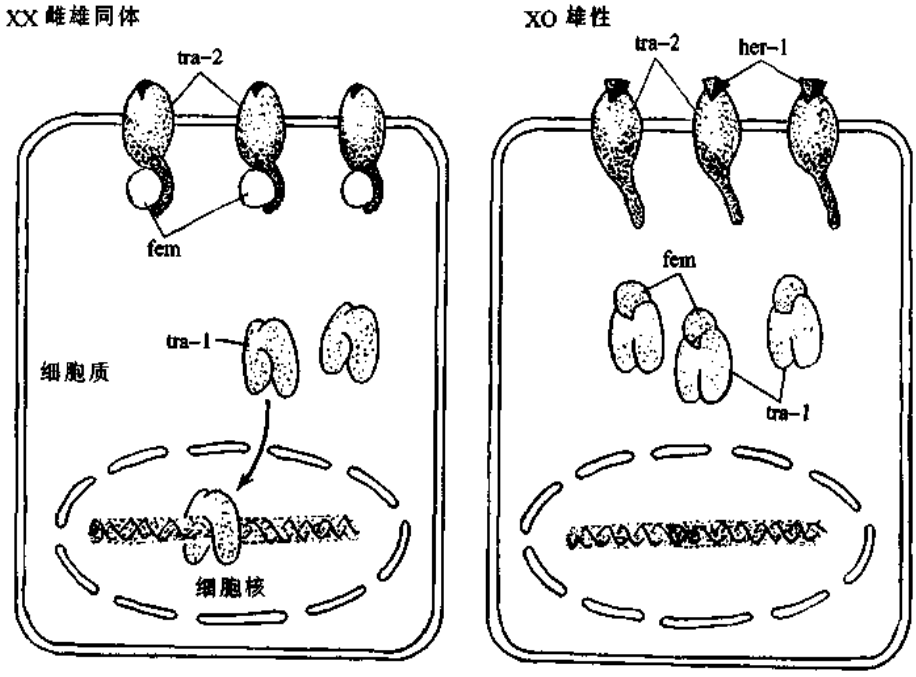


图 14.16　在秀丽线虫中性别决定基因活动假说的图示(仿 Kuwabara 和 Kimble,1992)

在 XX 个体中,fem 蛋白质通过 *tra-2* 产物在靠近细胞膜处被隔开。在缺少 fem 蛋白质的情况下,tra-1 蛋白质进入细胞核,并转录雌雄同体发育所需要的基因。在 XO 个体中,her-1 蛋白质结合于 *tra-2* 基因产物引起 *tra-2* 基因产物释放 fem 蛋白质。一旦在细胞质中游离 fem 蛋白质结合于 tra-1 产物,防止它进入细胞核

虽然雌雄同体在蠕虫和昆虫中较普遍,但它在脊椎动物中几乎看不到。在鸟类和哺乳类雌雄同体是一种病理状态,它引起不育。脊椎动物最普遍的雌雄同体是鱼类,它们显示几种类型的雌雄同体。一些鱼类是雌雄异体(gonochoristic),即它们具有染色体上确定的性别,它们或是雄性,或是雌性。有些雌雄同体鱼类是同步的(synchronous),其卵巢和精巢同时存在,精子和卵子同时产生,如 *Serranus scriba*。在自然条件或在鱼缸中,这些鱼形成排卵对(spawning pairs)。一条鱼产卵后不久,另一条鱼使其受精。此后两条鱼颠倒它们的作用,以前为雄性的鱼现在产卵,它同伴的精子使其受精。在另一些雌雄同体的种类中,在其发育过程中动物经历了遗传上程序化的性别变化。在这种情况下,性腺是二形的,具有雄性和雌性两个区域,在其生命一定时期,其中一个是主要的。在雌性先熟(protogynous)的雌雄同体中,一个动物以雌性开始它们的生活,但后来变为雄性。相反的情况是雄性先熟(protandrous),如 *Sparus auatus*,首先精巢占优势,在转变期精巢和卵巢都能看到,此后卵巢占优势。

第五节　环境的性别决定

一、爬行类依赖温度的性别决定

虽然大多数蛇和大多数蜥蜴的性别是在受精时由性染色体决定的，但大多数龟类和所有的鳄鱼种的性别是由受精后的环境决定的。在这些爬行类中，在发育一定时期卵的温度是性别决定的决定因子，温度的微小变化能引起性别比率发生重大变化。通常在较低温度(22～27℃)下孵化的卵产生一种性别，而在较高温度(30℃及以上)孵化的卵产生另一种性别。只有一个小的温度范围允许从相同的一窝卵中孵化出雄性和雌性。图 14.17 说明在一些龟类中突然变温诱导性别比率的变化。如果卵在 28℃以下孵化，所有孵化的龟将为雄性，在 32℃以上，每个卵产生的是雄性。因此，一窝卵通常产生相同性别的个体，但也有例外，如鳄龟(snapping turtle)产的卵在或冷于(≦20℃)或热于(≧30℃)的温度变为雌性，在二者之间的温度下，雄性占优势。

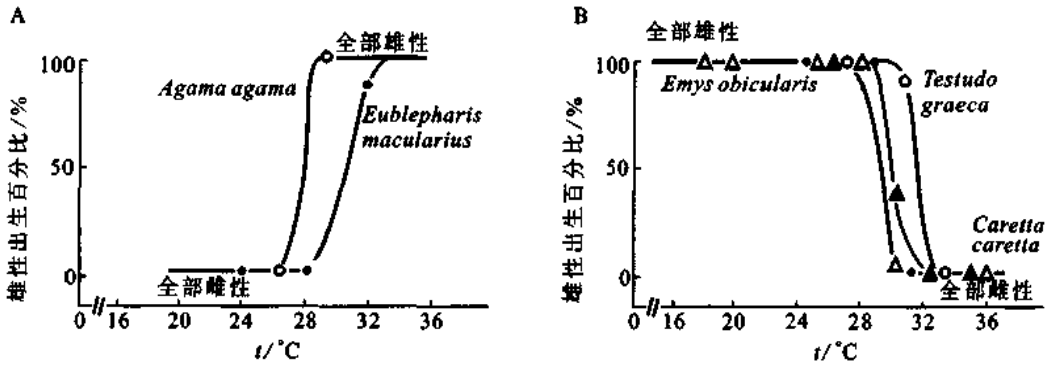


图 14.17　爬行类性别比率与孵化温度之间的关系

A. 2 种蜥蜴在较高温度下产生雄性后代　　B. 3 种龟类在较高温度下产生雌性后代

性别决定发生的发育时期能通过在产生雄性的温度下将卵孵化一段时间，然后将卵转移到产生雌性温度的孵卵器孵化进行研究。地图龟和鳄龟发育的中间三分之一好像是温度影响性别决定的时间。对密西西比鳄在实验室和野外进行的性别决定研究得出结论，性别是在孵化的 7～21 天之间决定的。培育于 30℃或以下温度的卵产生雌性鳄鱼，而在 34℃或以上温度孵育的卵产生的都是雄性。另外，巢筑在叶上的(接近 34℃)产生雄性；而巢建在湿沼泽上的产生雌性。因此，许多龟类和鳄鱼种类的性别是根据卵环境的温度决定的。依赖温度的性别决定具有它的优越性。其一是可能给这个物种以性别繁殖的好处，它不必拘束于 1∶1 的性别比率。如在鳄鱼中其性别比率可以大到 10 个雌性比 1 个雄性。依赖温度性别决定的主要缺陷可能是物种受存活的温度限制。这将意味着热污染(局部的或"全球热效应")可能在一定地区使一个物种消失。有人假设恐龙可能已经具有依赖温度的性别决定，它们的突然消亡可能是由于温度的轻微变化引起的，这种变化产生的状况使它们的卵只能孵化出雄性或雌性。

二、在蠕(*Bonellia viridis*)和拖鞋样蜗牛(*Crepidula formicata*)中依赖位置的性别决定

蠕的性别取决于幼虫固着的地点。雌蠕是一种海生的、定居在石上的动物,体长约 10cm(图 14.18)。然而,它具有一个管状鼻(proboscis),能伸展超过 1 m 长。此管状鼻具有两种功能:第一,它将食物从石上刮下并送入雌蠕的消化管中;第二,幼虫将降落到管状鼻上,并进入雌蠕的嘴中,然后迁移到子宫中并分化为 1~3mm 长的共生的(symbiotic)雄性。因此,当幼虫固着于石表面将变为雌性,但相同的幼虫固着于雌性的管状鼻上,它将变为雄性。雄蠕在雌蠕的体内度过一生,并使它的卵子受精。现已证实当幼虫在缺少成体雌蠕的情况下,其 90% 变为雌性。然而当这些幼虫培养于存在成体雌蠕或由其分离的管状鼻时,其中 70% 附着于管状鼻并发育为雄性的结构。这些结果最近被进一步证实(图 14.19)。

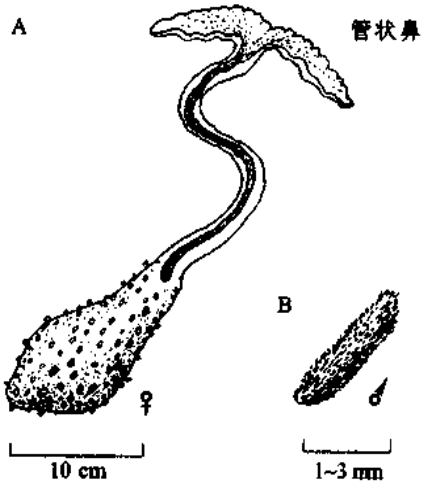


图 14.18 蠕极端的性别两形(仿 Barnes,1968)
A. 雌性,周长约 10cm,具有一个能伸展达 1m 管状鼻
B. 共生的雄性(与雌性相比高倍放大),体长 1~3mm

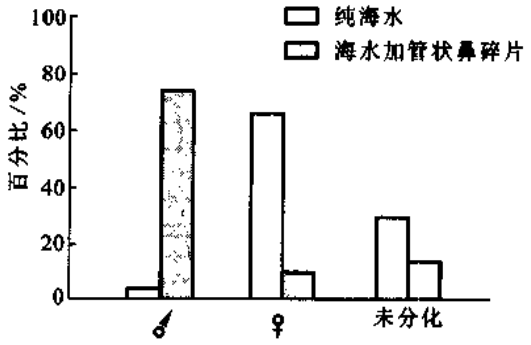


图 14.19 蠕(*Bonellia*)分化的体外研究分析
蠕的幼虫或置于正常海水中,或置于含雌性管状鼻碎片的海水中。大多数培养于含有管状鼻碎片海水的动物变为雄性,而正常海水它们将变为雌性

负责雄性化幼虫的分子能从雌性成体的管状鼻中提取分析。当幼虫培养于没有成体管状鼻的正常海水中时,大多数发育为雌性。当幼虫培养于含有管状鼻组织的水溶液提取中物时,大多数发育为或者雄性,或者间性的形式(intermediate form),没有完全的雄性,也没有完全的雌性。这种吸引幼虫到管状鼻并引起雄性化的成分现在已经提纯出来。

依赖位置性别决定的另一个例子是拖鞋样蜗牛(slipper snail),机体的位置影响它们的性别决定。许多个体彼此向上堆积,形成一个丘墩(图 14.20)。年幼的个体总是雄性。此期之后雄性的生殖系统退化,进入不稳定期。这时动物根据它们在丘墩中的位置,或为雄性,或为雌性。如果一个蜗

图 14.20 拖鞋样蜗牛的丘墩
其中两个个体正从雄性变为雌性。在它们变成雌性后,将被位于其上方的雄性受精

牛与雌性接触，它将变为雄性。如果将它与接触的雌性分开，它也将变成雌性。类似的，大量的雄性的存在将引起有些雄性变为雌性。然而，一旦一个个体变成雌性，它再也不会转变成雄性。

自然界中性别决定除以上介绍的染色体决定和环境影响的决定之外，还存在大量的性别决定的多样性。所以，对性别决定机制的了解还需要进行更深入的研究。

参考文献

1 Berkovitz G D, et al. The role of the sex－determining region of the Y chromosome(SRY) in the etiology of 46, XX true hermaphrodites. Hum. Genet., 1992, 88: 411～416

2 Berta P, Hawkins J R, Sinclair, A H, *et al*. Genetic evidence equating SRY and the testis－determining factor. Nature, 1990, 348: 448～450

3 Cline T W. Evidence that *sisterless－a* and *sisterless－b* are two of several discrete "numerator elements" of the X/A sex determination signal in *Drosophila* that switch Sxl between two alternative stable expression states. Genetics, 1988, 119: 829～862

4 Coschigano K T, Wensink P C. Sex－specific transcriptional regulation of the male and female doublesex proteins of *Drosophila*. Genes. Dev., 1993, 7: 42～54

5 Elbrecht A, Smith R G. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. Science, 1992, 255: 467～469

6 Gubbay J, *et al*. A gene mapping to the sex－determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. Nature, 1990, 346: 245～250

7 Haqq C M, King C Y, Donahoe P K, *et al*. Sry recognizes conserved DNA sites in sex－specific promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90: 1 097～1 101

8 Harley V R, *et al*. DNA binding activity of recombinant *SRY* from normal males and XY females. Science, 1992, 255: 453～456

9 Hodgkin J. Males, hermaphrodites, and females: Sex determination in *Caenorhabditis elegans*. Trends Genet., 1985, 1: 85～88

10 Konishi M, Akutagawa E. Neuronal growth, atrophy, and death in a sexually dimorphic song nucleus in the zebra fish brain. Nature, 1985, 315: 145～147

11 Koopman P, Münsterberg A, Capel B, *et al*. Expression of a candidate sex－determining gene during mouse testis differentiation. Nature, 1990, 348: 450～452

12 McElreavey K, Vilain E, Abbas N, *et al*. A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1993, 90: 3 368～3 372

13 MolMcLaren A, Sex determination in mammals. Trends Genet., 1988, 4: 153～157

14 Salz H K, Maine E M, Keyes L N, *et al*. The *Drosophila* female－specific sex－determination gene, *sex－lethal*, has stage－, tissue－, and sex－specific RNAs suggesting multiple modes of regulation. Genes. Dev., 1989, 3: 708～719

15 Vigier B, Watrin F, Magre S, *et al*. Purified bovine AMH induces a characteristic freemartin effect in fetal rat prospective ovaries exposed to it in vitro. Proc. R. Soc. Lond. [B], 1993, 252: 149～155

16 Zarkower D, Hodgkin J. Molecular analysis of the *C. Elegans* sex－determining gene *tra－1*: A gene encoding two zinc finger proteins. Cell, 1992, 70: 237～249

17 Zwingman T, Erickson R P, Boyer T, *et al*. Trranscription of the sex－determining region genes *Sry* and *Zfy* in the mouse preimplantation embryo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90: 814～817

第四篇

细胞分化的分子机制

个体发育的中心问题是细胞分化(cell differentiation),研究细胞分化的分子机制是探索发育机制的基础。细胞分化是指多细胞有机体的细胞从简单、原始的状态到复杂化、异样化方向发展的过程,是通过细胞分裂产生结构和功能具有稳定差异的过程。

在多细胞生物体内,每个细胞都有一定的性状,即细胞特定基因型在一定的环境条件下的表现,也称为细胞表型(cell phenotype)。根据细胞表型可将细胞分为三类:全能细胞(totipotent cell)、多潜能细胞(pluripotent cell)和分化细胞(differentiated cell)。把一个细胞定义为全能细胞,指它能够产生有机体的全部细胞表型,或者说可以产生一个完整的有机体,它的全套基因信息都可以表达。如:合子,海胆和有些动物

的早期分裂球等。多潜能细胞的基因表达受到一定的限制，表现出其发育潜能具有一定局限性，仅能分化成为特定范围内的细胞。如：多潜能性生血干细胞仅能分化成为淋巴细胞、单核细胞、粒细胞等。多潜能细胞后代的发育命运在一定程度上已被限定，它们即使在不同的环境条件下表现出某些相同的细胞表型。分化细胞是由多潜能细胞通过一系列分裂和分化发育成的特殊细胞表型。它们合成细胞特异性蛋白或具有特殊功能性的细胞器，有丝分裂的频率明显降低，有的甚至完全停止细胞分裂。细胞分化的过程是从全能细胞—多潜能细胞—分化细胞的发展过程，也是基因选择性表达的结果。分化细胞一般仅有5%～10%的基因表达，除了合成细胞生长、代谢必需的产物之外，主要是细胞特异性产物的合成。

在细胞分化的过程中基因表达的调控机制是很复杂的，例如在所有的细胞中都有微丝系统，微丝由肌动蛋白、肌球蛋白构成，肌肉细胞含有大量的肌动蛋白和肌球蛋白作为肌原纤维的成分，但是肌肉细胞中微丝的肌动蛋白和肌球蛋白与非肌肉细胞的这两种蛋白质并不同。它们在电泳时的泳动速度不相同，而且肌肉细胞与其他细胞中肌动蛋白的氨基酸序列也不同，是由不同基因编码的蛋白质。进一步的研究还发现不同肌肉的肌动蛋白也有差异，甚至骨骼肌与心肌的肌动蛋白也是由两种不同基因所编码的。另外在非肌肉细胞中也发现了两种肌动蛋白。这种差异很可能是由蛋白质合成后的生物化学修饰引起。目前已知大鼠的肌动蛋白是由三种不同基因编码的产物。

在细胞分化过程中，基因表达调控机制的复杂性还表现在有些相同的基因于不同的组织或不同的发育时期的调控机制可以不同，胶原蛋白基因表达的调控就是典型的例子。在不同发育时期和在身体不同部位的细胞产生不同类型的胶原蛋白。皮肤和趾虽然具有相同的胶原蛋白，但是在不同组织细胞中合成胶原蛋白的量有很大的差异，分子结构也不相同。胶原蛋白的分子是三聚体。骨、齿、真皮组织的胶原蛋白分子由两条相同的多肽链 α_1 和一条 α_2 链构成，属于Ⅰ型。软骨组织的胶原蛋白分子由三条相同的 α_1 链构成，属于Ⅱ型。人类皮肤含有Ⅲ型胶原蛋白，其分子结构也由三条相同的多肽链组成，但单链的结构较特殊，含有半胱氨酸。Ⅲ型胶原蛋白主要存在于胎儿皮肤中，成体皮肤中Ⅲ型胶原蛋白的含量仅为胎儿皮肤的1/3。此外基膜、离体培养的内胚层细胞含有Ⅳ型胶原蛋白。在不同细胞和不同发育时期胶原蛋白基因的表达发生改变是依赖于基因表达复杂的调控机制。又如血红蛋白合成的基因开关，功能性血红蛋白的分子是四聚体，成人血红蛋白的分子由两个 α 链和两个 β 链构成。在所有发育阶段的大多数血红蛋白分子都含有 α 链，但是在胚胎发育早期还存在 ζ 链。β 链在不同的发育阶段有四种变化即 β 链、γ 链、δ 链和 ε 链。这些链分别出现在发育的三个阶段，在早期胚胎发育时期是 ε 链，胚胎发育的中、后期是 γ 链，胚后发育阶段是 β 链和 δ 链。血红蛋白的合成既涉及量的改变也涉及质的变化，其基因表达的控制既有转录水平的调控又有翻译水平的调控。

细胞分化是基因差异性表达的结果，差异性基因表达产生的原因主要来自于两个方面。首先是细胞内环境的差异影响核基因的表达。在早期胚胎发育的卵裂阶段，由于卵质的不均匀分布，卵裂的结果所产生的分裂球（细胞）存在不同的细胞内环境，引起胚胎细胞核基因的差异表达。其次是细胞外环境的影响。在胚胎发育早期不同的胚胎细胞位于不同的区域，受到不同的外界环境的影响，接受不同的位置信息。特别是邻近细胞的相互关系，如胚胎诱导对于胚胎细胞分化具有重要意义。各种细胞外信号分子包括远离细胞的产物（细胞因子、激素等信号分子），通过细胞间的通讯，特别是信号传导（signaling）间接影响细胞核基因的表达。

第十五章　基因组相同和基因差异表达

大量的实验证据表明同一有机体的多种细胞具有完全相同的一套基因结构，即基因组相同(genome eqivalence)。这些具有相同基因结构的细胞由于基因表达受到复杂的调控，不同组织细胞发生差别基因转录，合成组织专一性产物，出现细胞形态和功能的分化。

我们知道多细胞有机体具有许多形态、功能和生物化学组成不同的细胞，如血红蛋白是红细胞中特有的蛋白质，晶体蛋白则仅存在于晶状体细胞中；神经视网膜细胞具有远距离传导电脉冲的能力而其临近的色素视网膜细胞却无此能力，但能合成色素颗粒。但是这些不同的细胞都来自于一个共同的始祖细胞——受精卵。从理论上讲，它们应该与受精卵携带相同的遗传信息和具有相同的基因结构，或者说这些细胞的基因组相同。只是在发育过程中不同的细胞利用了基因组中不同的基因或基因表达的调控机制不同，结果导致各类细胞合成其特有的蛋白。关于这一点，已有大量的胚胎学、遗传学、生物化学和分子生物学的实验证据。特别是随着分子生物学技术的日益完善，我们不仅可以测定各种细胞中 DNA 的组成和序列，还可以监控某种特定细胞中是否存在某些特殊的基因转录等。本章主要讨论在发育过程中基因组是否发生了不可逆的改变。

第一节　同一有机体不同组织细胞基因组相同的证据

一、遗传学证据：同一个体细胞的染色体和基因组相同

遗传学的研究早就显示，果蝇幼虫的许多细胞中有一种多线染色体(polytene chromosome)。这种多线染色体 DNA 可经历多次复制而不进行有丝分裂，形成 512 条，1 024 条，甚至更多条平行的 DNA 双螺旋结构，因此遗传学家在光学显微镜下可清楚地观察和研究多线染色体。他们发现这些染色体上有许多特征性的条带，果蝇的单倍体基因组约有 5 150 个不同的条带。在整个幼虫期和成体的不同组织细胞中染色体的数目是相同的，染色体上条带的图型也保持不变。Judd 和 Young (1973)和 Swanson 等(1981)认为这些染色体上条带的数目与果蝇基因的数目有明显的相关性。以后，大量的实验证据表明从同一个体不同组织细胞提取的 DNA 是一致的，进一步说明不同组织细胞的基因组相同。

二、胚胎学证据：已分化的细胞仍然具有发育成为其他细胞的潜能

对此，胚胎学的研究很早也提供了许多证据。Driesch(1892)用无钙海水分离 2－细胞、4－细胞、8－细胞、和 16－细胞期的胚胎，发现每个单独的卵裂球都可以发育成为正常的胚胎。这表明海胆的早期分裂球是全能性的。尽管在正常发育的胚胎中，一个早期分裂球只能产生胚胎的一部

分组织，却具有发育成为一个完整有机体的潜在能力。由此说明海胆早期分裂球的细胞核内具有分化产生其他各种细胞类型的基因。Spemann(1914)用发环限定蝾螈受精卵的实验证明蝾螈 32－细胞期卵裂球的核并未失去发育成为完整个体的潜能(见第七章)。以后他还发现如果将蝾螈原肠胚早期细胞移植到其他胚胎区域，这些细胞的预定命运可以发生改变分化成为其他类型的细胞。那么，发育命运已经决定的细胞或已分化的细胞是否还仍然具有其他细胞发育的潜在能力呢？以下两方面的实验证据说明的确如此。

首先是转决定(transdetermination)实验的证据。刚孵出的果蝇幼虫大约由 10 000 个细胞构成，其中有两类明显不同的细胞群，即含有多线染色体的大多数细胞和不具有多线染色体的约 1 000个细胞。前一类细胞迅速生长使体积增大到原来的 150 倍左右。后一类是不具有多线染色体的二倍体细胞，它们呈簇状分布在整个果蝇幼虫体内，我们称这些呈簇状的未分化细胞团为成虫盘(imaginal discs)(图 13.2)。成虫盘细胞在整个幼虫生长期一直处于分裂状况，到变态期(metamorphogenesis)由于激素的影响幼虫细胞退化，同时成虫盘细胞受信号刺激后分化成为成虫细胞，构成成虫的组织器官。幼虫的成虫盘细胞是已决定的细胞，若将一个幼虫的眼成虫盘细胞移植到另一个受体幼虫的腹部，变态后由受体幼虫发育成的果蝇腹部就会长出一只多余的眼睛。若将幼虫的成虫盘细胞移植到成虫体内则不发生细胞分化，但是这些成虫盘细胞可继续进行分裂，并且可以再通过移植到其他成虫体内继续培养、增殖。如果将它们再移植回变态期幼虫体内原来的位置则又能按原来已决定的命运进行分化。这说明已决定细胞的发育命运是比较稳定的。另一方面成虫盘细胞虽然是已决定的细胞，但它们的发育命运有时也是可以改变的，例如触角成虫盘经过多次移植之后部分触角成虫盘细胞分化形成成体果蝇的腿、翅或嘴。我们把这种成虫盘细胞未按其已决定的命运分化成为一定的器官而分化成为成体其他器官的现象称为转决定。处于转决定状态的细胞与处于决定状态的细胞一样也是相对稳定的，而且其稳定性可以通过成虫盘细胞的多次分裂进行遗传。转决定的现象说明发育命运已经决定的细胞仍然具有分化成为其他细胞的潜能。

另一方面的实验证据是转化(metaplasia)。蝾螈眼再生的研究表明已分化的细胞也仍然具有分化成为其他细胞的潜能。在正常的蝾螈胚胎发育中，晶状体由神经外胚层诱导其表面的上皮细胞产生。如果将晶状体原基移掉，其腹侧虹膜细胞可再生新的晶状体。如果将蝾螈胚胎视网膜原基移掉，色素视网膜细胞可再生新的视网膜。这种由已分化的细胞转分化为其他细胞类型的现象称为转化。

三、分子生物学证据：不同组织的细胞具有完全相同的核基因组 DNA

分子生物学的研究结果为基因组相同提供了更准确的证据。人们利用核酸分子杂交(nucleic acid hybridization)的方法表明有机体的不同组织细胞都拥有量和序列完全相同的核基因组 DNA。对小鼠多种细胞核 DNA 的分析进一步表明，用各种不同小鼠细胞的单链 DNA 可同样有效地抑制具有放射性标记的小鼠单链 DNA 探针与小鼠胚胎基因组的杂交。采用原位杂交(*in situ* hybridization)技术进一步显示，许多已分化细胞仍然含有不表达的其他组织专一性基因。已知只有雌性成体果蝇卵巢细胞和脂肪细胞具有合成卵黄蛋白的功能，而果蝇唾液腺细胞并不合成卵黄蛋白，但在果蝇唾液腺细胞的基因组中却同样具有编码卵黄蛋白的基因，而且这种基因在体外一定条件下仍然可以合成卵黄蛋白。

这些遗传学、胚胎学和分子生物学的证据均说明，一般情况下同一有机体的不同细胞，无论是

已决定的细胞或已分化的细胞都与未分化细胞的核相同，它们的细胞核都具有全部发育的潜能，都具有相同的全套基因结构，也就是说它们的基因组相同。

在分化细胞中未利用的基因于某些特定的条件下也可以被激活并表达合成其他细胞所特有的蛋白质。Weiss 等(1975)利用细胞融合的方法获得一种具有两个细胞核的细胞，于适当的条件下，融合细胞的两个细胞核同时进入减数分裂，并最终形成一个含有两个亲代细胞染色体的杂交核。在多数情况下杂交体不具有亲代细胞的分化特征。将一个 4 倍体的大鼠肝肿瘤细胞和一个 2 倍体的小鼠成纤维细胞融合，获得一种含有 4 倍体大鼠肝肿瘤细胞染色体和 2 倍体成纤维细胞染色体的杂交体。这种融合细胞具有产生大鼠肝细胞特异性白蛋白、醛缩酶和 TAT 等的能力，但也能产生小鼠肝细胞特异性白蛋白、醛缩酶和 TAT 等。在通常情况下小鼠成纤维细胞不表达肝细胞的这些特异性产物。上述实验结果说明，在小鼠成纤维细胞的基因组内也具有肝细胞特异性表达的基因，而且只要有适当的条件这些基因也可以表达。在细胞分化过程中基因组具有稳定性，一般没有不可逆转的遗传变化发生。这种情况与动物发育的普遍规律是符合的。

第二节　核潜能的限定

一、在发育中核潜能被限定

尽管不同细胞的核基因组相同，但有大量的证据表明，随着细胞分化的进行，核的发育潜能逐渐被限定。胚胎学家将不同发育时期两栖类胚胎细胞的核作为供体移植到去核卵中，结果可使发育开始和进行正常卵裂。Briggs 和 King(1952,1960)是最早用豹蛙(*Rana pipiens*)成功地进行核移植实验的科学家。他们将未分化的囊胚期细胞核移植进激活的去核卵(图 15.1)，结果有 60％的移植核能够指导正常卵裂形成囊胚，其中 80％～85％继续发育形成正常二倍体的蝌蚪。表明这些囊胚期细胞的核具有指导全部发育的潜能。但进一步的实验发现，用原肠胚早期内胚层的细胞核

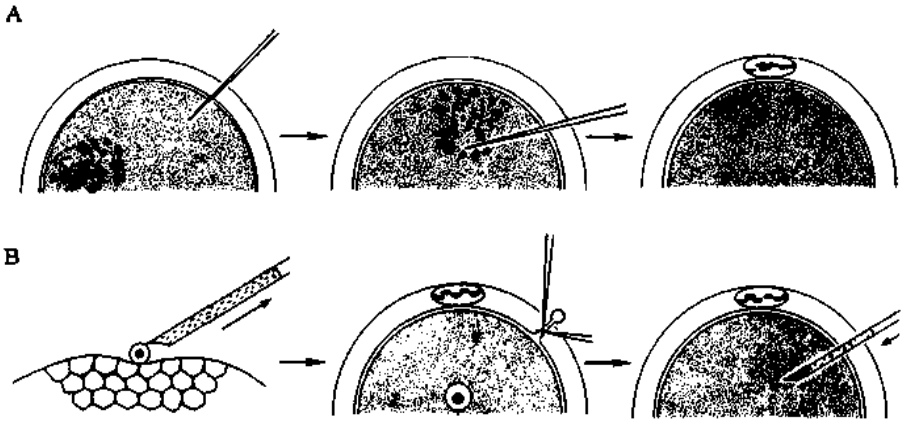


图 15.1　将豹蛙(*Rana pipiens*)囊胚期细胞的核移植进激活的去核卵中的过程

A. 示受体卵的准备。用玻璃针刺激卵子表面，使卵子激活；当卵核移到动物极为产生第二极体作准备时，核的位置正好靠近动物极细胞表面，用另一个玻璃针将卵核移去　B. 示供体核的准备和核移植。经分离液处理获得单个囊胚期供体细胞，用直径稍小的微吸管吸入细胞，使细胞膜破裂，将细胞核注射进去核卵

为供体进行核移植时，只有 50％的胚胎能够进行正常发育成为蝌蚪；若用神经胚内胚层细胞核为供体就仅有 10％以下的胚胎能够正常发育(图 15.2)。

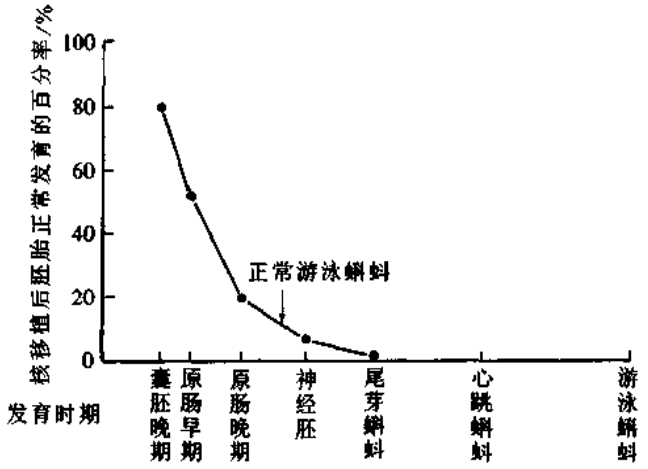


图 15.2 豹蛙不同发育时期的供体核获得成功核移植胚胎发育的时期和百分率
横坐标代表供体核来源胚胎发育的时期，纵坐标代表能正常发育的核移植胚胎发育的百分率

发育的时期越晚，体细胞核指导发育成蝌蚪的百分率越小。其他学者以不同发育时期的细胞核作为供体进行核移植实验也表明，尽管多数囊胚期细胞的核可指导发育进行至蝌蚪，但是发育稍后期的细胞核指导发育至蝌蚪的能力明显降低。用尾芽期蝌蚪的体细胞核作为供体移植时，不能指导正常的发育，但是尾芽期蝌蚪生殖细胞的核能够指导正常的发育。由此可见，随着个体发育的进行体细胞核指导发育的潜能被越来越限定，似乎丧失了指导完全发育的能力。体细胞核潜能的限定是稳定的且具有一定的组织特异性。采用具有组织特异性的原肠胚后期内胚层细胞核为供体时似乎易于形成内胚层细胞，指导发育成为外胚层和中胚层细胞的能力已受到限制。同样外胚层细胞核也出现类似发育潜能的丢失，如用外胚层细胞核为供体进行移核实验，产生发育异常的蝌蚪可具有正常的神经分化但是缺乏内胚层结构。在发育过程中体细胞核潜能的限定是一个普遍的规律。

二、细胞核具有潜在全能性的研究

为真正能评价细胞核的潜能，人们常常采用核克隆(nuclear cloning)的技术进行研究。这种方法是将供体细胞核先移植进激活的去核卵中，再将发育产生的大量卵裂期或囊胚期细胞核为供体，再次进行移植，移植到更多的去核卵中，通过此方法可制备出原来供体核的许多拷贝(图 15.3)。每个核克隆有其特征性的表型，同一克隆的核不仅指导发育的能力基本一致，而且所指导的发育被阻断的阶段也一致。即使经过几代克隆这些特征也保持不变。已分化细胞的核在经历这一系列的移植之后可以发生改变，其中有些细胞核变得可以指导整个有机体各种细胞的分化。如原肠胚后期内胚层细胞核可以指导发育成为正常的蝌蚪。甚至将已分化的小肠上皮细胞或红细胞的细胞核作为供体移植到去核卵中，也可以获得少数发育正常的蝌蚪或者成体。说明已分化的细胞和不同发育时期胚胎细胞的核与合子核同样，都含有物种的全套基因信息，都具有分化产生有机体各种细胞的潜能。

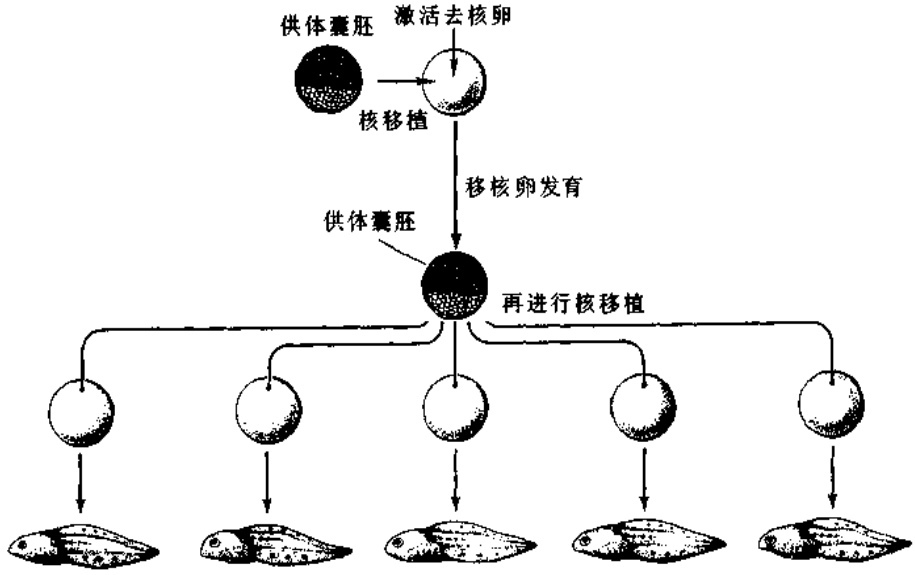


图 15.3　核克隆技术示意图

将供体细胞核先移植进激活的去核卵中，再将发育产生的大量卵裂期或囊胚期细胞核为供体，再次移植到更多的去核卵中，通过此方法可制备出原来供体核的许多拷贝

关于分化细胞核潜能限定的观点长期以来存在着争议。有些学者认为在分化细胞核的移植实验中很多情况下不能获得正常发育胚胎的原因，主要是由于核移植的方法使分化细胞核突然进入了一个高频率分裂的陌生胞质环境，因此容易引起染色体断裂。而染色体异常的现象在许多克隆的蝌蚪细胞中确实也观察到。若将其实验技术稍微改变，先通过核克隆使移植核逐渐地适应这种环境，即使用已分化细胞核作为供体也可以获得发育正常的蝌蚪。这表明很多分化细胞的核仍然是全能的。Gurdon(1966)的核移植研究结果不仅也与 Briggs 相同，而且发现经过核克隆的蝌蚪肠上皮细胞核有的可以产生蝌蚪的神经元、红细胞等其他类型的细胞，甚至有些蝌蚪可发育成为有生育能力的成体。充分说明了核的全能性。但是有些学者对 Gurdon 的实验进行了批评，他们认为有以下两方面问题。首先，Gurdon 所采用的供体核不能保证其中没有混入原生殖细胞的核，因为原生殖细胞在迁移过程中要经过和停留在肠上皮附近，也有可能被作为实验的供体核的来源。其次，实验采用的蝌蚪肠上皮细胞还不能代表已完全分化的细胞。为了证明他们自己的结果是正确的，Gurdon(1975) 及其合作者进一步用完全分化的成蛙蹼上皮细胞核进行核移植实验也获得了少数正常发育的神经胚。若将这种供体核经过一系列的移植还可以获得大量的蝌蚪，但是这些蝌蚪都在可饲养期之前死亡。用淋巴细胞核进行类似实验也遇到同样的发育阻断现象。我国著名实验胚胎学家童第周等从 20 世纪 60 年代开始进行细胞核移植的研究，在鱼类亚科、科和目间进行过一系列的核移植实验。

另一方面也有用已分化细胞核进行移植而获得成功发育的证据。已知红细胞是一种高度分化的细胞，红细胞核 DNA 已停止复制，也不再合成 mRNA。如果把红细胞的核移植到激活的去核卵内可以恢复 DNA 复制，开始正常发育并产生正常的游泳蝌蚪。另外皮肤细胞、红细胞等这些完全分化的细胞中许多无用的基因，在适当的条件下可以被重新激活并合成蝌蚪的神经、胃、心脏等细胞的特异性产物，这些细胞的核可指导有机体近乎于全部细胞类型的分化。

总之,从两栖类克隆实验结果的分析可归纳出以下结论。首先,伴随发育的进行有机体的体细胞存在着普遍的核潜能限定的现象,这种限定是确定的,而且具有供体核的特异性。其次,很明显分化细胞核基因组具有产生蝌蚪全部细胞类型的潜能。尽管关于分化细胞核具有全能性的问题长期以来存在激烈的争论,但是大量研究结果证明,许多分化细胞核具有全部发育的潜能,这一点是毫无疑问的。克隆羊 Dolly 的诞生(1997)对于说明体细胞核发育的全能性具有特别重要的意义。这是人类首次成功的用哺乳动物体细胞——成年母羊乳腺上皮细胞核为供体,经过多次核移植而获得的后代。随后克隆猴、克隆牛、克隆羊等一系列克隆动物的研究也获得了成功。获得克隆哺乳动物的技术路线如图 15.4 所示,移植的供体核都来源于成体动物的体细胞。这些研究成果进一步说明,绝大多数动物细胞的核都具有潜在的全能性。

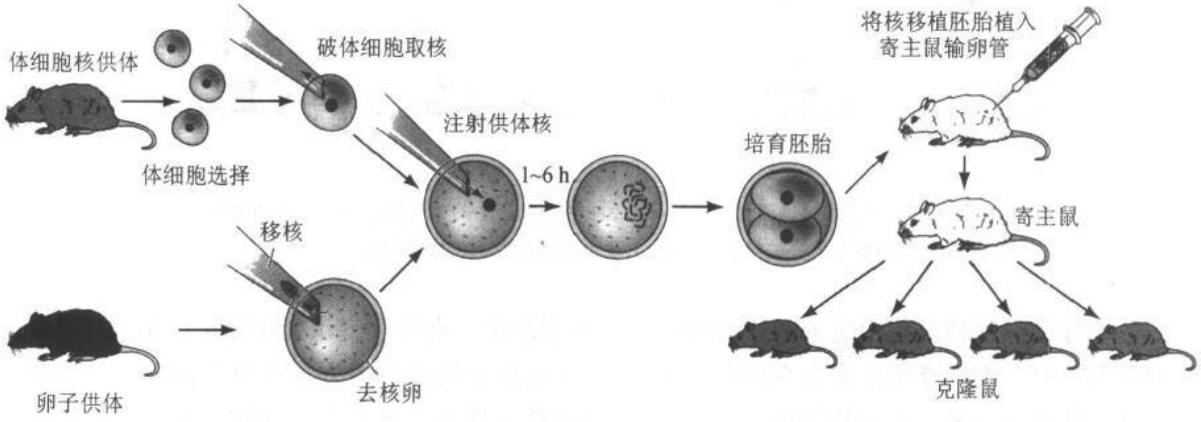


图 15.4 克隆哺乳动物的技术路线示意图

第三节 基因组相同的例外——基因组的改变

一般而言,有机体绝大多数细胞的核 DNA 保持相对稳定。在已分化细胞中不表达的基因仍然存在而且还具有潜在的全能性,都符合基因组相同的规律。但在有些特殊的细胞中基因组也发生了改变。

一、染色质消减

人们早就发现马蛔虫(*Ascari megalocephala*)体细胞的前体细胞在很早的卵裂阶段中经历染色质消减(chromosome diminution),约占 80% 以上的 DNA 被丢失,因此不再具备完整的基因组,所以仅有生殖系的细胞具有一整套完整的基因组结构。另外,又如瘿蝇(*Myaetiola destructor*)受精后开始的卵裂只进行细胞核分裂,细胞质并不分裂。当细胞核分裂至 16 个的时候,其中 14 个核的染色体中有 32 条不能向纺锤体极移动并在以后消失,仅保留 8 条染色体。拥有这些核的细胞不具有完整的基因组 DNA,将分化产生瘿蝇成体的体细胞,而拥有其余两个核的细胞后代发育成为生殖细胞。

二、基因重排

随着分子生物学技术的建立和发展，1976 年 Hozuni 和 Tonegawa 又揭示了另一不符合基因组相同的例外，即淋巴细胞分化过程中发生免疫球蛋白基因重排(gene rearrangement)使基因组发生了改变。他们首先比较分析了从小鼠胚胎细胞和 B 淋巴细胞瘤提取的 DNA，因为 B 淋巴细胞瘤是一种轻链分泌型细胞，可以看作已分化细胞。将两种细胞的基因组 DNA 经酶切、电泳分离成大小不同的片段，再将这些片段与具有同位素标记的两种 RNA 探针结合。这两种探针是整个轻链的探针和轻链恒定区的探针。结果整个轻链的探针可以与胚胎细胞的两个 DNA 片段结合，这两个片段的相对分子质量分别为 6.0×10^6 和 3.9×10^6；而轻链恒定区的探针只能与相对分子质量为 6.0×10^6 的 DNA 片段结合，也就是说小鼠胚胎细胞的轻链恒定区基因是相对分子质量为 6.0×10^6 的 DNA 片段，轻链可变区基因是相对分子质量为 3.9×10^6 的 DNA 片段。然而与 B 淋巴细胞瘤 DNA 片段结合的情况却显然不同，两种 RNA 探针都只能识别一种相对分子质量为 2.4×10^6 的 DNA 片段，轻链可变区和恒定区由同一 DNA 片段所编码，表明在 B 淋巴细胞分化过程中编码轻链可变区和恒定区的两个基因片段可能融合形成了一个新基因。

B 淋巴细胞是受到抗原刺激后能产生抗体的细胞。根据克隆选择学说的观点，有机体内本来就存在能识别各种抗原的 B 淋巴细胞克隆。每个 B 淋巴细胞表面都具有能识别一种特异性抗原的受体，每一个细胞产生的抗体分子仅能识别一种抗原和与相应抗原结合，一旦细胞表面抗原受体与特异性抗原结合，B 淋巴细胞就开始迅速分裂、分化成为分泌抗体的浆细胞。另一方面，也只有与特异性抗原结合的 B 淋巴细胞才能分裂和分化。因此，在受到抗原刺激以前，抗体分子已获得其特异性。这种抗体对特异性抗原的选择机制涉及到 B 淋巴细胞分化过程中新基因的产生。抗体分子由两对多肽亚基组成，含有两条完全相同的重链和两条完全相同的轻链(图 15.5)。

抗体分子的每条肽链又分为可变区和恒定区，重链可变区由重链氨基端的氨基酸组成，轻链可变区由轻链氨基端的氨基酸组成，可变区的结构决定抗体分子的特异性。恒定区由羧基端氨基酸组成，决定抗体分子的其他性质，如重链恒定区负责将分子固定在 B 淋巴细胞的质膜上。编码抗体分子四条肽链的基因都是由一些 DNA 片段组成的。编码轻链的基因含有 DNA 三个片段：第一个是 V 片段，负责编码轻链可变区氨基端的 97 个氨基酸，大约有 300 种不同序列的 V 片段；第二个是 J 片段，负责编码轻链可变区最后的 15～17 个氨基酸，有 4～5 个不同序列的 J 片段；第三个是 C 片段，负责编码轻链恒定区。在 B 细胞分化过程中，一个 V 片段和一个 J 片段经过移动和剪接形成轻链可变区基因，即经过基因重排，其结果丢失了有些 DNA 片段(图 15.6)。编码重链的基因含有四个片段：约有 200 种不同序列的 V 片段，负责编码重链可变区氨基端的 97 个氨基酸；10～15 种不同序列的 D 片段，编码 3～14 个氨基酸；四个不同序列的 J 片段，编码可变区最后的 15～17 个氨基酸；一个 C 片段编码重链恒定区。编码重链可变区的基因是由一个 V 片段、一个 D 片段和一个 J 片段经过基因重排而形成。在所利用的这三个片段之间的一些 DNA 片段在基因重排中被丢失。基因重排的结果是原来胚胎细胞基因组中不相连的 DNA 片段，通过剪接去掉一些 DNA 片段，重新组装形成抗体轻链可变区基因和重链可变区基因。此外，在 B 淋巴细胞分化过程中恒定区基因发生类型转换(class switching)。重链恒定区基因家族包括 μ、γ、α 和 ε 基因。B 淋巴细胞受到抗原刺激后分化成为分泌抗体的浆细胞，淋巴细胞开始分化时产生的抗体仅具有分泌前相同的 $C\mu$ 恒定区，由靠近重链可变区基因的第一个恒定区基因片段编码，由 $C\mu$ 恒定区负责抗体分子

在质膜上的固定。随着抗体的继续合成和分泌，恒定区基因的类型发生转换，可能变成 Cγ 或者 Cα、Cε 基因。由于可变区基因重排和恒定区基因类型转换的多样性使每个 B 淋巴细胞都具有其独特的基因组，能够合成特异性抗体。

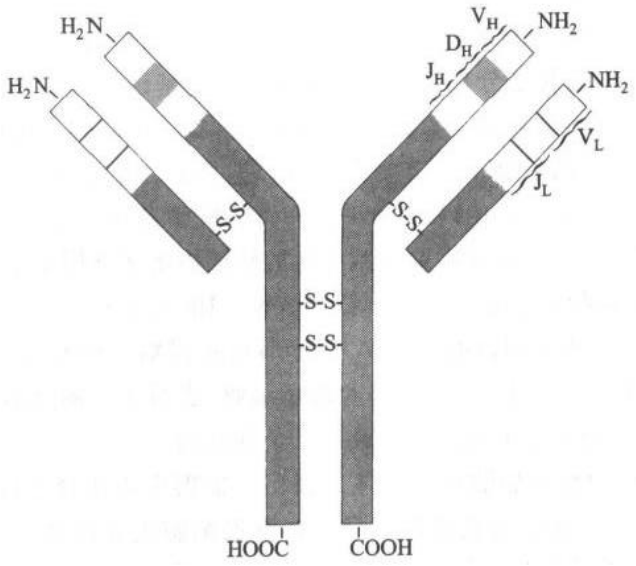


图 15.5 免疫球蛋白分子结构示意图

免疫球蛋白分子由两条相同的重链和两条相同的轻链构成，链间以二硫键相联。重链和轻链又分别由可变区和恒定区构成

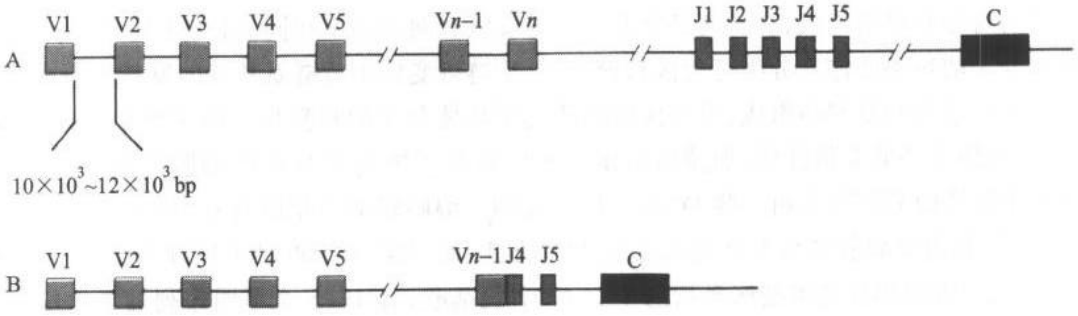


图 15.6 B 淋巴细胞发育过程中免疫球蛋白轻链基因重排示意图

图 A 表示原来的免疫球蛋白轻链基因的结构，图 B 表示抗体合成的 B 淋巴细胞中免疫球蛋白轻链基因结构。在细胞分化过程中，一个 V 片段和一个 J 片段经过剪接形成轻链可变区基因，并移到恒定区 C 片段附近

进一步的研究发现 T 淋巴细胞受体基因也是经历类似的基因重排而产生的。另外在酵母细胞分化过程中也存在基因重排现象。还有些基因的改变是由于转座子(transposon)的插入所引起的。转座子是可以迁移的片段，插入到基因组中去可以给细胞带来新的信息。但从淋巴细胞基因重排的例子中已可认识到，这些遗传信息的改变是细胞分化的结果而不是细胞分化的原因。

三、基因扩增

在胚胎发育的某特定时期，某特殊基因被选择性复制出许多拷贝的现象称为基因扩增(gene

amplification)。早在 20 世纪 60 年代 Brown 和 Dawid 对非洲爪蟾(*Xenopus*)卵母细胞核糖体 RNA 基因(r－DNA)扩增就进行了研究。卵母细胞的基因扩增从变态期(metamorphogenesis)开始，一直延续到卵母细胞成熟之前。经过基因扩增，减数分裂前的卵母细胞中 r－DNA 已达到体细胞的 2×10^5倍。这些扩增的基因都位于染色体之外形成许多小颗粒，从电子显微镜下观察到核仁增加。这种情况可以一直维持到蝌蚪时期。以后发现 r－DNA 扩增的现象广泛存在于许多动物的卵子发生中，另外发现果蝇编码卵壳蛋白的基因也有基因扩增的现象。

对于两栖类核糖体 RNA 基因的结构了解得最清楚，位于核仁组织者区的核糖体 DNA 以成串重复的形式排列(图 15.7)。18S、5.8S 和 28S 三种 rRNA 基因连在一起，构成一个大的核糖体 RNA 基因转录单位。这种单位在 DNA 链上串联重复约 5 000 次。每个转录单位具有一个 5′的前导序列，以后依次是 18S rRNA 基因的编码序列、转录间隔、5.8S rRNA 基因、转录间隔、28S rRNA 基因。在这些基因之间没有内含子，以整个转录单位转录成为一个 40S rRNA 前体，再由后者产生三种 rRNA。

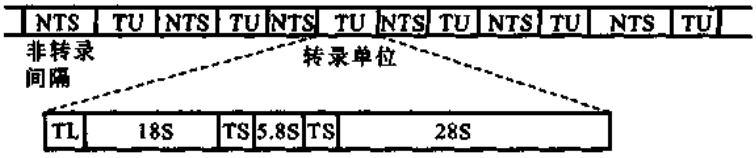


图 15.7　两栖类 18S，5.8S 和 28S 核糖体 RNA 的基因结构示意图

TU 为转录单位，NTS 为非转录间隔，TS 转录单位中间隔，TL 是前导序列，18S、5.8S 和 28S 分别示 18S、5.8S 和 28S 核糖体 RNA 基因

关于核糖体 RNA 基因扩增的机制已有不少研究。在每个爪蟾二倍体细胞中这种大核糖体 RNA 基因有两个同源区，每个同源区大约包括 450 个转录单位的拷贝，它们之间由非转录区间隔分开。染色体上核糖体 RNA 基因的转录单位都是一致，但非转录间隔区的长短不一样，即使在同一条染色体上也不一样。从理论上计算，在 DNA 已经复制后的二倍体卵母细胞中应该包括 4×450 个编码核糖体 RNA 的基因。但是事实上发现的核糖体 RNA 基因的拷贝达到上百万个之多，核仁的数目也不是 4 个而是数千个。这些位于核外的核仁与核内进行有丝分裂的染色体也不相连。用同位素标记的 28S 核糖体 RNA 为探针与卵母细胞和体细胞 DNA 进行原位杂交，可见卵母细胞核糖体 RNA 基因扩增了 1 500 倍。若按正常情况下每个核包含 450 个基因拷贝计算，也就是说在爪蟾卵母细胞中有 6.8×10^5个大核糖体 RNA 前体。若分离爪蟾(*Xenopus laevis*)卵母细胞和体细胞的核 DNA，将它们经过 dAT 线性化后分别进行 $CsCl_2$ 密度梯度离心，可以看到两种 DNA 都有相同的密度梯度 1.699 g/mL 的主峰，但是卵母细胞核 DNA 还有一个 1.729 g/mL 的卫星峰，这是由 r－DNA 基因扩增所产生。另外扩增的 r－DNA 的碱基配对与其他的基因组 DNA 也有差异，这种动物一般基因组 DNA 的 GC 配对是 40%，而 r－DNA 的 GC 配对占 67%，在体细胞中 r－DNA 仅占基因组 DNA 的 0.06%，不能形成独立的、可检测的卫星峰。当该基因扩增 1 500 倍后所形成的 DNA 带就很容易与主带区分了，这种 DNA 也只能与核糖体 DNA 杂交，而与其他任何基因都不能杂交。

通过基因扩增可转录产生大量的 RNA，但是基因扩增并不是普遍现象。关于基因扩增的机制

还不能完全阐明，但是有一点可以肯定即将扩增的基因首先要脱离染色体，然后才能复制出大量的DNA。关于核糖体基因结构形成的机制，一般认为可以用许多病毒基因复制的滚环模型来解释。也就是说卵母细胞的一个核糖体基因以某种方式发生改变，使染色体形成环状，从环的缺口处向两个方向进行复制，形成核糖体基因拷贝和这些基因拷贝之间的间隔序列。用电子显微镜研究基因扩增也观察到染色体外核仁区有典型的封闭环，也支持用滚环模型解释基因扩增的机制。

两栖类卵母细胞中进行基因扩增的核糖体 RNA 基因是第一批分离和纯化出的基因，也是在电子显微镜下首先观察到其转录过程的几个基因。这些基因在卵母细胞有丝分裂中期大量转录成rRNA。在电镜下可以看到转录从"染色质树"的小端开始进行，直到大核糖体 RNA 前体形成。在 DNA 链和 RNA 转录连接处有个 RNA 聚合酶分子，这些大转录复合物中 RNA 长约 7 200 bp，与核糖体前体的大小基本吻合。同时也能观察到在转录单位之间的非转录间隔。

果蝇(*Drosophila melanogaster*)卵子合成卵壳蛋白期间，编码卵壳蛋白的基因也经历基因扩增。卵壳蛋白在卵巢滤泡细胞中合成。在卵壳蛋白基因表达之前，滤泡细胞的基因组 DNA 经历超量 DNA 合成，使之达到单倍体 DNA 的 16 倍。通过这个过程使卵壳蛋白基因被选择性地增加复制。这种基因扩增的现象在其他组织中尚未检测到，仅见于果蝇卵巢滤泡细胞且只发生在基因组 DNA 的特殊区域。这些特殊区域的特点是有几个分支，每个分支都包含扩增的卵壳蛋白基因。在这种情况下发生的基因扩增，这些基因 DNA 仍然与染色体相连。

许多大量表达的基因并不采用选择性基因扩增的机制，如在红细胞的发育过程中，血红蛋白的合成量一直维持在红细胞蛋白合成总量的 98%，但是并不存在血红蛋白基因选择性扩增的机制。在毛虫的丝腺中有大量丝蛋白纤维产物，丝腺细胞的整个基因组在多线期进行基因扩增，但是丝纤维蛋白基因并不经历选择性基因扩增。可能只是在某些基因的表达中存在选择性基因扩增的机制。

我们必须注意到，前述基因组遗传信息发生改变的现象仅仅存在于某些特殊细胞中，而有机体绝大多数分化细胞的核 DNA 保持相对稳定，它们的基因组相同。由于分化细胞仍然含有同样的基因组，必须通过一系列复杂的基因表达的调控，使不同的细胞产生不同的蛋白质。

参考文献

1 Bartolomei M S, Tilghman S M. Genomic imprinting in mammals. Annu. Rev. Genet., 1997, 31: 493～525

2 Briggs R. Genetics of cell type determination. Int. Rev. Cytol[Suppl], 1979, 9: 107～127

3 DeChiara T M, Robertson E J, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor Ⅱ gene. Cell, 1991, 64: 849～859

4 DiBerardino M A. Genomic potential of differentiated cell analyzed by nuclear transplantation. Am. Zool., 1987, 27: 623～644

5 Gurdon J B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelial cells of feeding tadpoles. J. Embryol. Exp. Morphol., 1962, 10: 622～640

6 Gurdon J B, Laskey R A, Reeves O R. The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized cells of adult frogs. J. Embryol. Exp. Morphol., 1975, 34: 93～112

7 Hadorn E. Transdetermination in cells. Sci. Am., 1968, 219: 110～120

8 King T J. Nuclear transplantation in amphibia. Meth. Cell. Physiol., 1966, 2:1～36

9 McGrath J, Solter D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. Science, 1984, 226:1 317～1 319

10 Orr N H, *et al*. The genome of frog erythrocytes displays centuplicate replications. Proc. Natl. Acad. Sci., 1986, 83:1 369～1 373

11 Prther R S, *et al*. Nuclear transplantation in the bovine embryo: Assessment of donor nuclei and recipient oocytes. Biol. Reprod., 1987, 37:859～866

12 Reyer R W. Regeneration in the lens in the amphibian eye. Q. Rev. Biol., 1954, 29:1～46

13 Tung T C, *et al*. Cell differentiation in ascidian studies by nuclear transplantation. Scientia Sinca, 1977, 22:222～233

14 Willadsen S M. Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature, 1986, 320: 63～65

15 Wilmut I, *et al*. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, 1997, 385:810～813

16 Yan S Y, *et al*. Developmental incompatibility between cell nucleus and cytoplasm as revealed by nuclear transplantation experiments in teleost of different families and orders. Int. J. Dev. Biol., 1990, 34:255～265

第十六章　染色质水平基因活性的调控

早在20世纪20年代，遗传学家和胚胎学家就发现他们研究的许多问题都涉及到如何解释生物发育中遗传性状的改变和遗传潜能的变化，遗传学和胚胎学的研究有共同的研究目标。为此，大家都集中精力研究细胞核和细胞质的相互关系。Driesch(1894)提出关于细胞核和细胞质相互关系的假说，认为在细胞中细胞核含有发育的遗传信息和具有遗传的潜能，细胞质能够激活细胞核的遗传信息，使后者产生新的产物；而这些新的产物进入细胞质后，能够再对细胞核起作用。由于核质相互作用的结果引起细胞分化。以后，Morgen (1934) 在此假说的基础上进一步指出：受精卵内本来就存在卵质的不均匀分布现象，在卵裂过程中每个子细胞核与不同区域的卵质结合形成子细胞。由于细胞质不相同，各子细胞中所激活的核基因也不同，而且各种新的基因产物又分别影响细胞质的成分，进一步再影响细胞核内基因的表达。这样就出现一系列细胞核和细胞质的相互作用并且最终导致细胞分化。直到60年代以后上述假说才有了充分的实验证据。

随着分子生物学的建立和发展，分子生物学与遗传学的相互渗透，有关真核生物基因表达的控制机制了解得越来越深入，现在我们知道DNA分子中携带着两种遗传信息：一种是负责编码蛋白质氨基酸组成的结构基因DNA序列；另一种是编码基因选择性表达调控的DNA序列，是基因组中的大部分DNA序列。蛋白质参与和调控生活细胞的一切代谢活动，而确定蛋白质的结构和合成时间、空间次序性的信息均由特定的DNA序列编码。基因表达就是遗传信息的转录和翻译。生物的个体发育由一定的遗传程序控制，即遗传信息的表达按一定的时间、空间发生变化。生物的发育还要随着环境的变化而发生改变。

真核生物的DNA主要集中存在于细胞核内，并与蛋白质结合，构成以核小体为基本单位的染色质(chromatin)结构。染色质可根据在细胞分裂间期折叠压缩的状况分成异染色质(heterochromatin)和常染色质(euchromatin)。染色质结构发生变化是基因转录的前提。

第一节　异染色质

异染色质存在组成型和兼性型两种类型。组成型异染色质(constitutive heterochromatin)DNA序列的折叠组装状况始终不发生改变，也从不进行转录，但是对于基因表达的调节起着重要的作用。兼性型异染色质(facultative heterochromatin)在某些情况下DNA序列折叠压缩的状况可以发生改变，成为常染色质并具有转录活性；而在另一些情况下又可转变成为异染色质失去转录活性。这个现象称为异染色质化(heterochromatization)，如雌性哺乳动物的两个X染色体中有一个随机失活的现象就是典型的例子。

一、X 染色体失活

早在 1949 年，Barr 和 Bertram 就发现雌猫细胞核的核膜旁有个染色比较深的小颗粒，命名为 Barr Body，以后认识到它是一个失活的 X 染色体。Barr Body 广泛地存在于雌性哺乳动物中。Mary Lyon（1961 年）对此曾提出一个假说，认为两个 X 染色体在发育过程的某一阶段必然有一个发生失活，但是二者中哪一个失活则是随机的，也就是说各有 50% 的可能性。此外 X 染色体的失活是不可逆的，即具有失活 X 染色体细胞的后代都存在失活的 X 染色体。她们做过下面两个实验（图 16.1）。第一个实验是根据控制毛色的基因位于 X 染色体上进行设计，采用一种黑/白毛色杂合（heterozygous）的雌性小鼠进行研究，这种杂合雌性小鼠是毛色嵌合体（mosaic），即呈现出一块黑毛、一块白毛的现象。这种杂合小鼠本身就间接地证明了她的假说：在胚胎发育的某一阶段黑色毛控制基因或白色毛控制基因所在的 X 染色体产生随机失活（random inativation）。其后代细胞不是具有黑色毛控制基因的 X 染色体失活，就是具有白色毛控制基因的 X 染色体失活，但不可能同时表现两种毛色存在的情况。为了进一步弄清 X 染色体在发育过程中失活的具体时间，她又进行了第二个实验。她将上述黑白毛色嵌合小鼠囊胚期的胚胎细胞，移植到另一种黄毛色纯合子雌鼠的胚胎中，再把这种胚胎放回母鼠子宫内使之发育成为幼鼠。如果移植的胚胎细胞在寄主体内发生 X 染色体失活现象，则幼鼠的毛色应该是两种颜色，如果不是黄/白色毛相间，就应该是黄/黑色毛相间的嵌合体，而不会是黄/黑/白色毛三种颜色。如果被移植的囊胚细胞不发生 X 染色体失活，幼鼠的毛色应该是三种颜色的嵌合体。研究的结果发现，在 3.5 d 以前将黑/白小鼠囊胚细胞移植进黄小鼠寄主胚胎产生三色鼠；但于 3.5 d 以后进行移植却发育成为两色鼠。这个实验证明了在小鼠中 X 染色体发生失活的时间大约在胚胎发育 3.5 d。

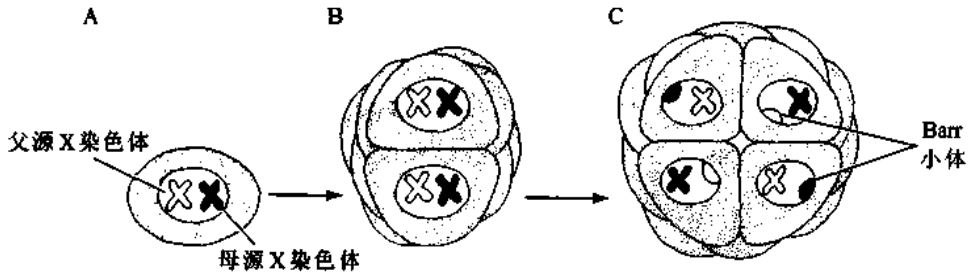


图 16.1 X 染色体的随机失活

A. 合子具有两个不同来源的 X 染色体 B. 在早期卵裂阶段，所有的细胞中两个 X 染色体均具有活性
C. 在胚胎发育的某个时期，所有细胞的一个 X 染色体发生随机失活

以后有些重要的证据是通过对人类细胞系的生物化学研究得到的。人类有一种遗传疾病叫 Lesch－Nyhan 综合症，是因为缺乏与 X 染色体相连接的次黄嘌呤核苷酸转移酶（hypoxanthine phosphoribosyltransferase，HPRT）引起的。当雄性因为 Lesch－Nyhan 综合症产生突变，X 染色体受损或死亡时，这种疾病可以通过 X 染色体遗传。然而，在雌性存在 *HPRT* 突变基因时，可被细胞内另一个具有野生型 *HPRT* 等位基因的 X 染色体遮盖。如果一个妇女的儿子有 Lesch－Nyhan 综合症，可以认为她是这种疾病的传递者，因为她的两个 X 染色体中有一个携带 *HPRT* 突变基因。Barbara Migeon（1971）将 *HPRT* 基因杂合子妇女的皮肤细胞进行单克隆培育，再检测这些克隆发

现其中大约一半的克隆携带野生型 *HPRT* 基因。又如葡萄糖－6－磷酸脱氢酶(G－6－P dehydrogenase isozyme,G6PD)有两种主要的同工酶,编码这两种同工酶的基因分别位于两个X染色体上。如果两个X染色体都具有活性的话,应该每个个体的细胞同时合成这两种葡萄糖－6－磷酸脱氢酶的同工酶。有一种杂合子人后代的皮肤细胞具有编码两种同工酶的活性基因,能同时合成两种同工酶。将这种杂合子人后代的皮肤细胞进行克隆培养,再分析不同克隆细胞的情况,结果发现每个克隆的细胞却并不同时合成两种同工酶,而是仅合成其中一种同工酶(图 16.2)。这说明事实上每个细胞都有一个X染色体失活。这种X染色体失活的现象,也存在于女性生殖细胞具有二倍体基因组的前体细胞中,但是在卵子发生过程中进行减数分裂的时候,失活的染色体又重新恢复活性,所以卵母细胞具有完整的遗传信息。至于失活的染色体恢复活性的机制尚不清楚,但是两个X染色体对于生殖细胞的功能都是必需的。从上述的例子看来体细胞的两个X染色体中总是有一个要失活,似乎体细胞只需要一个X染色体存在即可,事实上即使在体细胞中X染色体的缺失也会导致疾病发生。有一种人类生长、发育迟钝综合症就是由于女性患者X染色体缺失引起的。患者的体细胞有一个X染色体缺失,在幼年时期就出现卵巢萎缩的现象。

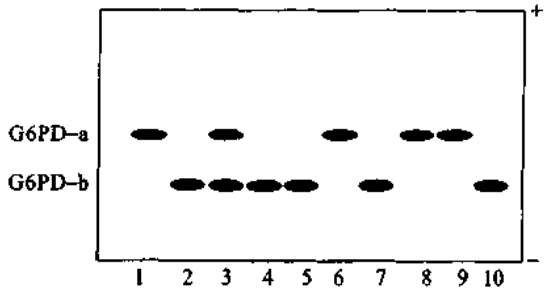


图 16.2 妇女皮肤细胞的葡萄糖－6－磷酸脱氢酶的同工酶(G6PD)电泳结果

图中1,2示两个纯合子妇女的皮肤细胞分别具有G6PD－a或G6PD－b泳动带;3示杂合子妇女的皮肤细胞同时具有G6PD－a和G6PD－b泳动带;4～10示经克隆培养的杂合子妇女皮肤细胞,7个不同的克隆,每个克隆的细胞只有其中一种G6PD泳动带

X染色体失活是随机的,但在某些情况下可能也具有一定的选择性。日本人 Ohno(1980)用放射线照射小鼠,使其X染色体的基因发生突变,再将基因突变鼠(O^{hv})与正常鼠交配产生杂合子。杂合子X染色体基因失活的情况并不是野生型和 O^{hv} 型的失活各占 50%,而是以保留有活性的 O^{hv} 基因为优势。为解释此现象他提出了细胞核中存在保护分子的设想,认为哺乳动物雄性个体的细胞中只有一个X染色体,而雌性个体细胞中有两个X染色体,但是其中有一个X染色体失活仅有一个具有转录活性,这是一种剂量补偿效应。Mary Lyon 关于X染色体失活的假说可以很好地说明在转录水平分化基因的失活机制,但目前还没有充分的实验证据。X染色体失活对于体细胞而言是永久性的,但在雌性生殖细胞进入减数分裂之前的阶段,失活的X染色体能短暂的复活,所以在成熟卵母细胞中两个X染色体都具有活性。关于这一点可以通过检测葡萄糖－6－磷酸脱氢酶的同工酶来证明。成熟卵母细胞能同时合成两种主要的葡萄糖－6－磷酸脱氢酶同工酶,它们是由位于两个不同X染色体上的基因所编码。X染色体的失活虽然是随机的,但是这种随机性也有一定的规律,在有些例子中常常是父源性的X染色体失活,如雌性小鼠的所有滋养层细胞几乎只能检测到母源性X染色体的性质,而缺乏父源性X染色体上基因的表达。又如有袋类动物所有胚胎细胞父源性的X染色体都失活。尽管我们对这些现象发生的原因还不了解,但是X染色体失活可能是转录水平基因表达的重要控制机制之一。值得注意的是X染色体失活并不是整个X染色体失活,而只是位于X染色体长臂上的所有基因失活,位于X染色体短臂上的几个基因,如编码类固醇的硫酸酯酶基因并没有这种剂量失活的过程。也就是说并不是整条X染色体都发生异染

色质化。在这些未失活的基因中,可能存在引起 X 染色体失活信号传导分子的编码基因。近年来对于 X 染色体失活的分子机制的研究显示,*Xist* 基因在 X 染色体失活时特异性表达,*Xist* 基因具有调控小鼠发育中 X 染色体失活的功能。

二、水蜡虫的染色体失活

最引人注目的染色体失活现象见于水蜡虫(*Planococcus citri*)。这种动物雌性个体的细胞中不具有兼性型异染色质,但是雄性个体细胞的一整套单倍体父源性染色体经历异染色质化而失去转录活性,甚至本来在雄性亲代的细胞中是具有转录活性的常染色质,在传递给雄性子代时也转变成为异染色质。这样在雄性动物的细胞核中存在一套单倍体母源性的常染色质和一套单倍体父源性异染色质。在精子发生的减数分裂中,异染色质化的染色质也不进入精子的细胞核,精子细胞核中仅具有一套单倍体母源性的遗传信息。精子与卵子结合受精,如果产生雄性后代,精子携带来的染色体再次经历异染色质化而失去转录活性(图 16.3)。其结果在雄性个体中除了少数组织中出现异染色质化逆转的情况之外,进行表达的基因几乎全部是母源性的。Brown(1961)用 X 射线照射水蜡虫,再把经过照射的水蜡虫与未经过照射的水蜡虫进行交配。其后代的发育情况不一致,只要雌性亲代经过 X 射线照射,而雄性亲代是未经 X 射线照射正常的后代,不管是雌性的还是雄性的幼体均大量死亡;如果雌性亲代是未经 X 射线照射,而雄性亲代是经过 X 射线照射的正常后代,尽管雌性幼体死亡数仍然很多但雄性幼体死亡的却比较少。上述实验结果进一步说明雄性水蜡虫细胞核中染色质的情况不同于雌性水蜡虫。

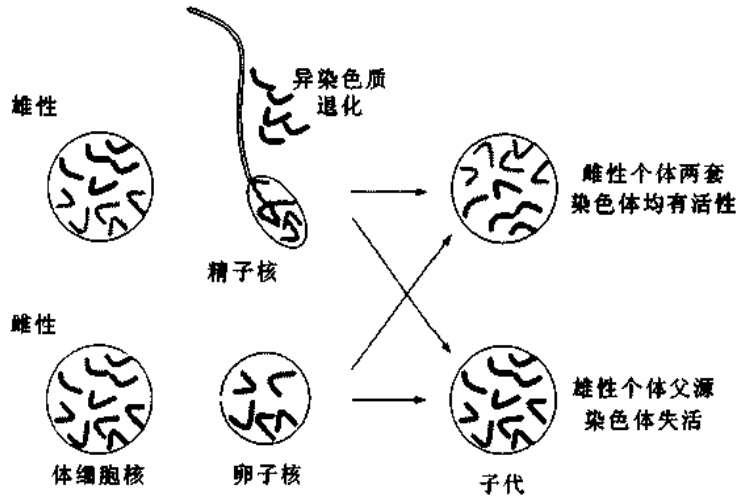


图 16.3 水蜡虫的染色体失活

雌性体细胞不发生染色体失活,雄性体细胞的一整套单倍体父源性染色体经历异染色质化而失去转录活性。在精子发生的减数分裂中,异染色质化的染色质不进入精子的细胞核,精子细胞核中仅具有一套单倍体母源性的遗传信息。受精后如果产生雄性后代,精子携带来的染色体再次经历异染色质化而失去转录活性

染色体失活现象是发生在转录前的一种基因调整。这种调控机制是使大量的基因异染色质化,进而使这些基因的转录停止。

第二节 选择性基因转录的染色质变化

对于染色体胀泡(chromosome puff)和灯刷染色体(lampbrush chromosome)的研究有助于说明特殊基因转录前的控制和选择性基因转录。

一、染色体胀泡

染色体胀泡是指染色体上 DNA 解聚的特殊区域,是基因转录活跃区。果蝇和双翅目昆虫的多线染色体是否有胀泡和胀泡的位置,在不同的组织细胞和同种细胞所处的不同发育时期均存在很大差异,具有组织和发育时期的特异性。表明染色体上基因的转录是按一定的时间和空间顺序进行的。

当用蜕皮素处理体外培养的果蝇唾液腺细胞时,染色体上产生一些新的胀泡但是原有的一些胀泡退化。新胀泡的形成,是由蜕皮素和染色体上的特殊部位结合所介导的。利用兔抗蜕皮素抗体为一抗,荧光素标记的羊抗兔抗体为二抗,进行荧光染色可以检测出染色体上蜕皮素结合的位置,即对蜕皮素敏感的胀泡。在幼虫时期蜕皮素敏感的胀泡大致可分成三种:在蜕皮素刺激后能诱导退化的胀泡,被蜕皮素刺激后 1 h 内能迅速产生的胀泡和在蜕皮素刺激后几个小时才能出现的胀泡。这些胀泡所合成的产物对于诱导以后产生的胀泡是必需的。如果在前一批胀泡刚形成不久,就在果蝇唾液腺细胞体外培养体系中加入蛋白质合成抑制剂,蜕皮素的刺激就不能引起后来的胀泡产生;同样,如果用突变的方法排除前一批胀泡,后一批胀泡也不能产生。这说明蜕皮素和前一批胀泡的产物都是后一批胀泡产生的必要条件。值得注意的是蜕皮素不仅能诱导一定区域的胀泡形成,同时也能诱导一些在第三期幼虫存在的胀泡退化。在第三期幼虫中,有一个胀泡位于第三号染色体左臂上 68C 处,这个胀泡包含 *Sgs3* 基因,编码一种粘合蛋白分子,其功能是粘合和固化蛹的表面。如果在体外培养果蝇唾液腺细胞体系中加入蜕皮素,可引起这个胀泡迅速的退化,停止 *Sgs 3* 基因的转录。但是,对于果蝇第三期幼虫用蜕皮素刺激时,并不能诱导该胀泡的退化,*Sgs 3* 基因表达产物粘合蛋白能够正常合成,以保证蛹的形成和表面形态的发生。蜕皮素调控基因活性的机制如图 16.4 示。

基因的转录活性与染色质的改变相关,这些改变可以通过非组蛋白与染色质的结合进行介导。用 DNA 酶 I 酶解果蝇染色质可以释放出一种相对分子质量为 63×10^3 的蛋白质,这种蛋白质可以与果蝇幼虫中所有蜕皮素敏感的位点结合。这种对于染色质结构的建立和维持具有重要意义的蛋白质,对于基因的激活也是必需的。昆虫幼体细胞多线染色体上的蓬松区,位于 DNA 解聚的特殊区域,可观察到数千个具有同样特征胀泡的 DNA 链。

二、灯刷染色体

在两栖类卵母细胞染色体的松散 DNA 处可以看到昆虫染色体胀泡的类似物,这种结构就是灯刷染色体。在减数分裂的双线期成对排列的每个染色单体,自染色粒向一侧伸出许多大的 DNA 侧环,在显微镜下可观察到类似于灯刷的结构。这些侧环在双线期完成后再缩回去。蝾螈卵母细胞在双线期,每个染色单体上约有 5 000 个侧环,大的侧环长达 50～100 μm,含有 10^6 个核苷酸分

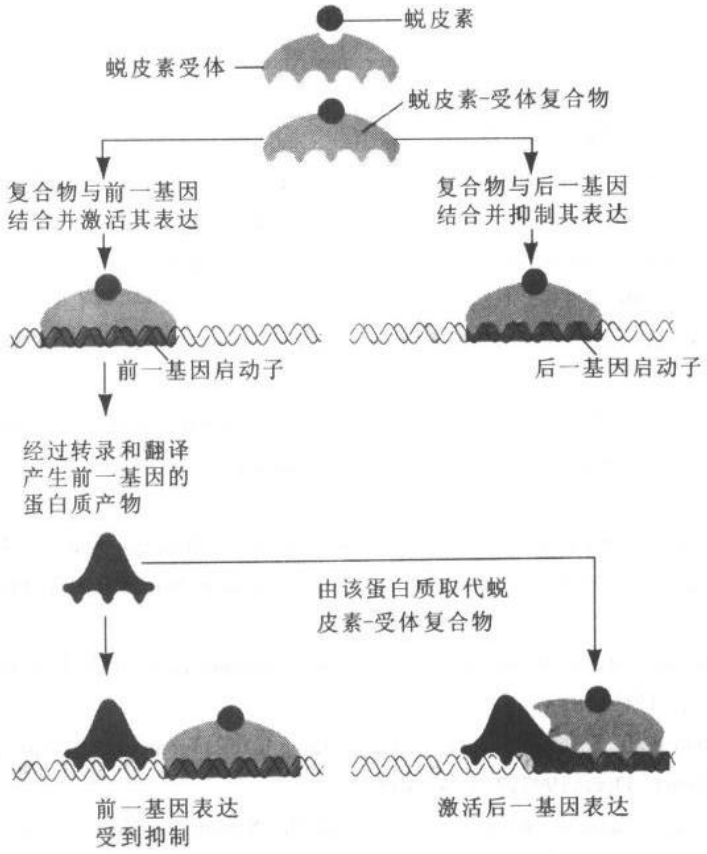


图 16.4 蜕皮素调控基因活性机制示意图

蜕皮素和前一批胀泡的产物都是后一批胀泡产生的必要条件。蜕皮素首先必须与其受体蛋白质结合形成复合物，复合物与前一批胀泡基因结合并激活其表达，同时与后一批胀泡基因结合并抑制其表达。前一批胀泡基因的蛋白质产物取代复合物激活后一批胀泡基因并抑制自身的转录

子。用原位杂交的方法可以证明染色体侧环上的一些基因的转录，如组蛋白基因的活跃转录。灯刷染色体基因转录的电子显微镜照片与扩增的核糖体 RNA 基因转录的情况很相似，也有类似的"染色质树"的极性，但是除了一些基因家族如组蛋白基因之外，一般所观察到的一个环是一个转录单位。灯刷染色体可以产生大量的 mRNA，是卵子发生中信息大量产生和积累的途径之一。这些 mRNA 主要为早期发育所利用。

参 考 文 献

1 Barr M L, Bertram E G . A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. Nature, 1949, 163: 676

2 Borsani G, *et al*. Characterization of a murine gene expressed from the inactive X Chromosome. Nature, 1991, 351: 325～329

3 Brockdorrf N, *et al*. The product of the mouse *Xist* gene is a 15－kb inactive X－specific transcript containing no

conserved ORF and located in the nucleus. Cell, 1992,71: 515～526.

4 Brown C J, Willard H F. The human X－chromosome inactivation. Nature,1994,368: 154～156

5 Brown C J, *et al*. A gene from the region of the human X inactivation center is expressed exclusively from the inactive X chromosome. Nature,1991,349: 38～45

6 Brown C J, *et al*. The human *XIST* gene: Analysis of a 17－kb inactive X－specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. Cell,1992,71: 527～542

7 Brown C J, Carrel L, Willard H F. Expression of genes from the human active and inactive X chromosomes. Am.J.Hum.Genet.,1997,60: 1 333～1 343

8 Costanzi C Pehrson J R. Histone macro H2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals Nature,1998,393: 599～601

9 Driscoll D J Migeon B R. Sex difference in methylation of single－copy genes in human meiotic germ cells: Implications for X chromosome inactivation, parental imprinting and the origin of PGC mutations. Somat Cell. Mol. Genet., 1990,16: 267～268

10 Felsenfeld G. Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. Nature ,1992,355: 219～225

11 Gartler S M, Liskay R M,Grant N. Two functional X chromosomes in human fetal oocytes. Exp. Cell Res.,1973, 82: 464～466

12 Kay G F, *et al*. Expression of Xist during mouse development suggests a role in the initiation of X chromosome inactivation. Cell,1993,72: 171～182

13 Kioussis D, Festenstein R. Locus control regions: Overcoming heterochromatin－induced gene inactivation in mammals. Curr. Opin. Genet. Dev.,1997,7: 614～619

14 Kuroda M I, *et al*. The maleless protein associates with the X chromosome to regulate dosage compensation in *Drosophila*. Cell,1991,66: 935～947

15 Lee J T, *et al*. A 450－kb transgene displays properties of the mammalian X inactivation center. Cell,1996,86: 83～95

16 Lyon M F. Gene action in the X chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). Nature,1961,190: 372～373

17 Migeon B R, Jelalian K. Evidence for two active X chromosomes in germ cells of female before meiotic entry. Nature, 1977, 269: 242～243

18 Panning B, Dausman J, Jaenosch R. X chromosome inactivation is mediated by *Xist* stabilization. Cell,1997,90: 907～916

19 Penny G D, *et al*. Requirement for *Xist* in X chromosome inactivation. Nature,1996,379: 131～137

20 Tagaki N, Abe K. Detrimental effects of two active X chromosome on early mouse development. Development, 1990,109: 189～201

第十七章　转录水平的调控

差异基因表达的调控是通过以下几个水平完成的。① 差别基因转录：调节哪些核基因转录成RNA；② 核 RNA 的选择性加工：调节哪些核 RNA 进入细胞质并加工成为 mRNA；③ mRNA 的选择性翻译：调节哪些 mRNA 翻译成蛋白质；④ 差别蛋白质加工：选择哪些蛋白质加工成为功能性蛋白。不同基因表达的调控可以发生在不同的水平，有些基因的表达例如编码血红蛋白的珠蛋白基因的表达则需要在多个水平进行调控。在这几个水平之中，差别基因转录的调控是最重要的调控机制。

第一节　基因表达的时间和空间特异性

尽管一般情况下同一有机体的各种二倍细胞的基因组相同，但是在细胞分化过程中核基因的表达已逐渐被限定，各种分化细胞仅有少量基因具有活性。利用核酸分子杂交技术，人们研究了来源于不同种动物的多种细胞的基因转录。这些研究结果表明：细胞分化程度越高，胞质 RNA 与核 DNA 的杂交率越低，已分化细胞的杂交率一般低于 10%。同时所合成的 RNA 主要是与细胞分化功能有关的特异性基因的产物和维持细胞正常代谢所必需的管家基因（housekeeping gene）的产物。因此分化细胞所合成的 RNA 是有组织特异性的，所以产生不同的蛋白质。前面已提到，果蝇多线染色体基因转录活跃的胀泡的出现具有组织和发育时期的特异性。这表明染色体上基因的转录是按一定的时间和空间顺序进行的。

发育中许多基因的表达存在时间和空间的特异性，这种特异性是受发育的遗传程序控制。基因表达的时间特异性是指有些特异性的基因，只有在发育的某个特定时期或某些时期才具有活性，而在其他时期则是无功能的基因。为研究发育控制的分子机制，需要弄清某特定发育时期有哪些特异性基因转录，这些基因转录的调控机制，也常常需要克隆这些特异性基因。Sargent 和 David (1983)为了研究在爪蟾受精卵中无功能而在原肠胚期特异性表达的基因，采用“减法式克隆技术”获得了成功。首先他们分别提取了爪蟾受精卵和原肠胚期的 mRNA，将原肠胚期的 mRNA 反转录成为 cDNA，再将这些 cDNA 与大量受精卵的 mRNA 混合、杂交。在此实验体系中，如果受精卵的 mRNA 与原肠胚期的 cDNA 能够杂交，说明这些 cDNA 所对应的 mRNA 在受精卵和原肠胚期都存在；相反，不能杂交的 cDNA 所对应的 mRNA 在受精卵中不存在，仅存在于原肠胚期。因此再去掉双链杂交分子就可以得到原肠胚期特异性 cDNA。进一步用载体连接进行克隆，获得原肠胚期特异性 cDNA 文库。他们还提取各发育时期包括从单细胞的受精卵到尾芽期的 mRNA，用某些基因的 cDNA 探针进行斑点印迹（dot blotting）实验，检测这些基因在特定发育时期的表达。放射自显影的结果发现囊胚中期（受精后约 7 h）是 17 种基因转录的转折期。这些基因在此时期之前均不表达，但有些基因到了转折期就立即开始转录如 *DG*64 和 *DG*39；而有的基因如 *DG*72 和 *DG*81 在原

肠胚中期才开始转录。有些基因一旦激活其转录活性就维持不变;而有些基因如 *DG56* 和 *DG21* 则有明显的变化。

基因表达的空间特异性主要指基因表达的组织特异性。关于这一点,许多证据来自于利用原位杂交(*in situ* hybridization)技术进行的研究。利用这种技术可以显示特定核酸在组织或细胞中的定位。如用标记的内胚层特异性 cDNA 探针进行原位杂交时只能在内胚层细胞中检测到其对应的特异性 mRNA,而在外胚层和中胚层细胞中均无法检测到这种特异性转录产物。

第二节 发育中基因转录水平的调节和变化

一、卵清蛋白基因的转录

一般母鸡产的卵外面都包裹着很多层卵膜以保护卵子。这些卵膜是卵子从卵巢排除后经过输卵管时形成的。卵子在左侧输卵管漏斗部受精,不久这里就积聚大量卵清蛋白。以后受精卵经过输卵管漏斗部进入输卵管本部时,又遇到由输卵管本部黏膜中管细胞分泌的卵白蛋白,再进入输卵管峡部形成壳膜。最后才进入子宫,在子宫内利用水、无机盐、碳酸钙为原料形成壳后产出。

输卵管本部黏膜管细胞分泌的主要产物是卵清蛋白,产卵母鸡的卵清蛋白中 50% 以上来源于管细胞分泌的蛋白。卵清蛋白的产生依赖于雌性激素的存在。雌性激素是一种固醇类激素,固醇类激素是疏水性分子可以自由出入细胞膜。当雌性激素进入细胞后可被激素受体蛋白识别,二者结合形成雌性激素-受体复合物。在发生构相变化后,复合物通过核膜孔进入细胞核并与染色质的特定区域结合,启动和促进卵清蛋白基因的转录。给年轻的母鸡注射雌性激素可以引起输卵管本部黏膜中管细胞的分化,合成卵白蛋白的主要成分:卵清蛋白、附蛋白素、卵粘蛋白和溶菌酶。在注射雌性激素后两周之内卵清蛋白的含量从原来无法检测到的低水平迅速升高,达到细胞全部新合成蛋白总量的一半以上。停止使用雌性激素可使卵清蛋白合成停止再降低到无法检测的水平,甚至使细胞恢复到未分化状态。

输卵管本部管细胞中卵清蛋白的合成主要是依靠基因转录水平的控制。提取输卵管细胞的卵清蛋白 mRNA,并用以进行反转录制备 cDNA 探针。利用 cDNA 探针可以检测注射雌性激素之后,管细胞的核中有卵清蛋白基因产物出现。

二、珠蛋白基因的转录

红细胞发育中珠蛋白基因的表达是细胞分化转录控制的最好例子。对鸡、小鼠和人胚胎发育中血红蛋白合成的变化进行了系统的研究。利用珠蛋白 mRNA 反转录制备的 cDNA 探针,对鸡胚红细胞发育中血红蛋白最初的转录进行监控。当分离孵化 20~23 h 鸡胚后部明区中的血岛时,能观察到红细胞的前体细胞。若利用 cDNA 探针进行检测,可发现这些前体细胞的血红蛋白基因并未开始转录。但是再经过两次以上的细胞分裂之后,当鸡胚孵化 35 h,红细胞的前体细胞已分化成为幼红细胞,此时血红蛋白迅速合成。这表明血红蛋白基因正是在这一段发育时期开始启动转录。

血红蛋白基因在转录水平控制的另一种形式发生在以后的发育阶段。血红蛋白是一个四聚体蛋白质,在人和许多动物种群中,胚胎、胎儿和成体红细胞的血红蛋白分子的组成不相同(图

17.1)。人胚胎血红蛋白由两个 ζ－珠蛋白链、两个 ε－珠蛋白链和四个血红素分子组成。于妊娠第二个月 ζ－和 ε－珠蛋白链的合成突然停止，而 α－和 γ－珠蛋白链合成量增加。由两个 α－和两个 γ－珠蛋白链组成胎儿的血红蛋白分子。到妊娠第三个月时 β－和 δ－基因开始表达，产物量逐渐增加，同时 γ－珠蛋白基因表达逐渐停止。出生后血红蛋白分子的组成迅速转换，由胎儿型代之于成体型，即 $\alpha_2\beta_2$。正常成体的血红蛋白分子中 $\alpha_2\beta_2$ 占 97%，$\alpha_2\delta_2$ 为 2%～3%，$\alpha_2\gamma_2$ 为 1%。人的 ζ－和 α－珠蛋白基因位于第 16 号染色体上，而 ε、γ、δ 和 β－珠蛋白基因相连，在第 11 号染色体上依次排列(图 17.2)。β－珠蛋白基因家族的表达显示了的一种控制机制，即指导其从胚胎型—胎儿型—成体型转变的顺序开关。

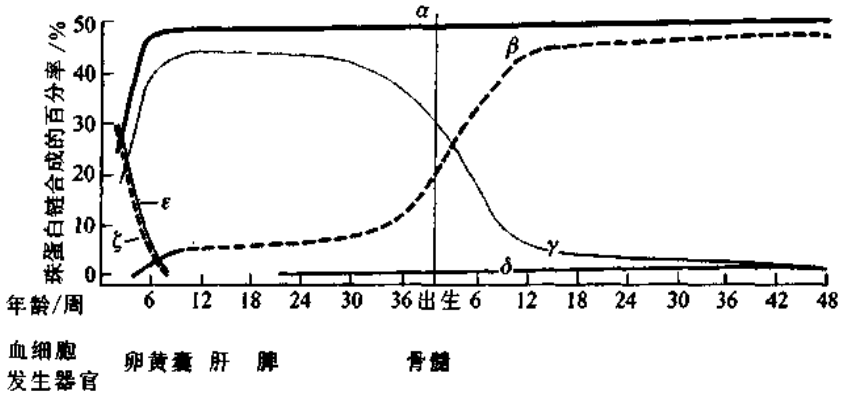


图 17.1　人血红蛋白在不同发育时期的分子组成

纵坐标表示不同珠蛋白链合成的百分率，横坐标表示不同的发育时期。红细胞发生的位置最初在卵黄囊，随后由胚肝取代，不久胚脾也开始造血，于出生前后开始逐渐由骨髓承担造血功能

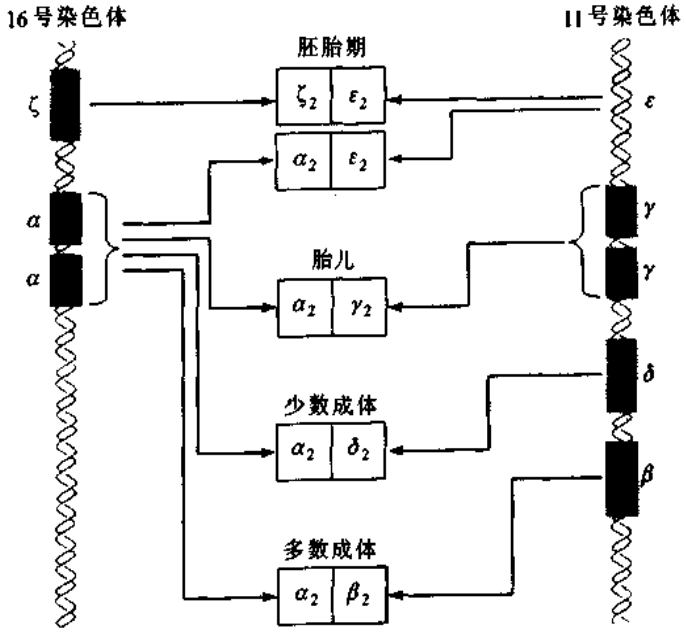


图 17.2　人的珠蛋白基因

人 β－珠蛋白基因家族位于第 11 号染色体。它们彼此相连，按 ε、γ、γ、δ 和 β 的次序排列。珠蛋白基因 ζ、α、α 位于第 16 号染色体。β－珠蛋白 LCR 位于 ε－珠蛋白基因上游 6～22 kb 的 DNA 序列内。箭头示 DNA 酶 I 高敏感区

DNA 上存在一些序列称为位点控制区(locus control region,LCR)。这些 LCR 的功能像是一种"超级增强子",由它们建立一种"开放"的染色质结构,不受正常转录的限制,使转录跨越几个相邻基因进行。在 β-珠蛋白基因家族上游,即 ε-珠蛋白基因上游 6～22 kb 的 DNA 序列中有 β-珠蛋白 LCR。由 β-珠蛋白 LCR"开放"这些基因所在区的染色质,使这些基因能够与转录因子接近。关于 LCR"开放"的染色质的机制,目前还不清楚。

三、转录调控蛋白对 5S 核糖体 RNA 基因表达的控制

1. 中心启动子元件

在整个发育过程中 5S rRNA 基因表达的控制都是在转录水平进行的。非洲爪蟾基因组具有两个编码 5S rRNA 的多基因家族,即卵母细胞型和体细胞型。单倍体基因组中有 20 000 个卵母细胞型的 5S rRNA 基因和 400 个体细胞型的 5S rRNA 基因,前者主要在卵母细胞中表达而后者在所有的细胞中表达。体细胞型基因家族仅占 5S rRNA 基因的 2%,但是却承担合成体细胞的 95%以上 5S rRNA 的任务,卵母细胞型基因家族在体细胞中转录水平很低。而在卵子发生早期两种 5S rRNA 基因都开始大量转录,从卵子发生后期到囊胚中期两种 5S rRNA 基因都大量表达。但到囊胚晚期情况发生改变,只能检测到体细胞型的 5S rRNA 基因具有转录活性,卵母细胞型的转录活性已无法检测到。

5S rRNA 基因产物是由 RNA 聚合酶Ⅲ所控制的。RNA 聚合酶Ⅲ与 RNA 聚合酶Ⅰ、RNA 聚合酶Ⅱ启动子的位置不同,它具有一个特殊的、位于基因中间的启动子。如果将具有非洲爪蟾 5S rRNA 基因的质粒加入到非洲爪蟾卵母细胞核蛋白提取物中,可以检测到以质粒 DNA 为模板的基因转录。再采用多种不同的删除方法进行研究:若去掉 5′末端上游区转录起始位点前的全部序列,并不影响该基因的正常表达,只有删除的片段超过基因序列中第 5 5 位点以后转录才停止;若从 3′末端开始向上游进行分步删除,除非删除到 5′末端第 80 位否则该基因仍然可以正常表达。若将 5S rRNA 基因中间 55～80 位点间的 DNA 片段连接到其他的 DNA 分子上,也可以引起其他 DNA 分子从其上游 55 位点处起始转录。这说明 5S rRNA 基因的启动子位于基因的中间 55～80 位点。非洲爪蟾的 5S rRNA 基因中 55～62 的 AGCAGGGT 序列是启动子由其控制基因的转录。此外 50～69 位点间的 A 区和 80～90 位点间的 C 区为有效转录启始所必需。转录因子 TFⅢA 能与启动子 C 区直接结合,启动子 A 区参与 RNA 聚合酶Ⅲ与 TFⅢA 的相互作用。

2. TFⅢA 的转录调节

进一步的研究发现还有许多辅助因子参与 RNA 聚合酶Ⅲ对不同启动子区的识别和结合,转录因子 TFⅢA 参与 RNA 聚合酶Ⅲ对非洲爪蟾 5S rRNA 转录的控制。如果将非洲爪蟾 5S rRNA 基因克隆到质粒上,再提取这种质粒与 RNA 聚合酶Ⅲ共孵育,结果并不能发生转录。如果改用具有 5S rRNA 基因的染色质与 RNA 聚合酶Ⅲ共孵育,或者用克隆 5S rRNA 基因的质粒、爪蟾卵母细胞的核蛋白提取物与 RNA 聚合酶Ⅲ共孵育,都可保证转录的发生。这是在由于后两种体系中存在一种 M_r 38.5×10^3 的蛋白质,这种蛋白质能够与 5S rRNA 基因的控制区结合,有助于后者与 RNA 聚合酶Ⅲ分子的结合。如果没有这种蛋白质分子的存在,5S rRNA 基因是没有活性的。这种蛋白质叫做 TFⅢA,既是 RNA 聚合酶Ⅲ控制中的第一个转录因子也是 5S rRNA 基因的专一性转录因子。在每个卵母细胞中存在 10^{12} TFⅢA 分子,但在每个体细胞中只有 10^3 TFⅢA 分子。TFⅢA分子与 5S rRNA 基因中间启动子的结合力很弱,相比之下非特异性转录因子 TFⅢC 能够

更牢固的与 5S rRNA 基因中间启动子相结合，所以 TFⅢA 分子与 TFⅢC 结合形成 TFⅢA－TFⅢC复合物。当 RNA 聚合酶Ⅲ与该复合物结合时 5S rRNA 基因的转录即发生。

转录因子 TFⅢA 拥有 9 个串联排列的锌指区，能像 9 个手指似的与 5S rRNA 基因中间启动子区的 50 bp DNA 序列结合，参与 RNA 聚合酶Ⅲ对非洲爪蟾 5S rRNA 的转录。锌指区可能是通过锌指区上的 α 螺旋与 DNA 结合。锌指区以串联重复单位的形式识别不同长度的 DNA 序列。

3．转录控制的决定："开关基因"(switch gene)

在发育中有些基因是否表达，可以决定细胞向两种不同的命运分化。如线虫的 *lin－12* 基因，果蝇的 *Notch* 基因和脊椎动物的 *MyoD1* 基因，我们称它们为开关基因。野生型线虫胚胎有两种可相互作用的邻近细胞：Z1.Ppp 和 Z4.Aaa，其中一种产生子宫颈(齿)细胞(ac)，另一种产生腹侧子宫前体细胞(vu)(表 17.1)。在 *lin－12* 基因隐形突变的动物中 *lin－12* 基因不转录，两种细胞都分化成为 ac 细胞。在有的突变体中 *lin－12* 基因具有高转录活性，两种细胞都分化成为腹侧子宫前体细胞，即 vu 细胞。*lin－12* 基因对于两种发育途径具有双重'开关'的作用。果蝇有一种细胞具有分化成为皮肤细胞或神经母细胞的双重潜能。当 *Notch* 基因突变时可以引起这种具有双重发育潜能细胞的分化命运发生改变。在原肠作用后不久沿果蝇胚胎腹中线分布的约 1 800 个外胚层细胞具有形成腹侧神经索的潜能。在正常情况下大约这些细胞中的 1/4 分化成为神经母细胞，其余的细胞成为皮下组织的前体。但对于每个外胚层细胞而言发育成为神经母细胞或者皮下组织的潜能是同样的。在 *notch* 基因转录缺乏的胚胎中全部细胞只能分化成为神经母细胞，而不能同时分化产生皮下组织和神经母细胞，结果所产生的胚胎在头部和腹部都具有超量的神经细胞，不能进行正常发育而导致死亡。*notch* 基因已克隆，该基因转录于早期胚胎发育阶段。NOTCH 和LIN－12 蛋白都是穿膜蛋白，NOTCH 蛋白是果蝇和脊椎动物神经系统非常重要的受体分子，作为邻近细胞信号分子的受体，在信号传导中起重要作用。

表 17.1　*lin－12* 基因突变与细胞分化的命运

突变	细胞			
	Z1.Ppp	Z4.Aaa	M.v.(l/r)pa	M.d.(l/r)pa
lin－12(+)	腹侧子宫前体细胞或子宫颈细胞		生殖中胚层细胞	体腔细胞
lin－12(0)	子宫颈细胞		体腔细胞	体腔细胞
lin－12(d)	腹侧子宫前体细胞		生殖中胚层细胞	生殖中胚层细胞

另一种重要的开关基因是 *MyoD 1*，从肌母细胞（myoblast）分离的 DNA 能够改变脂肪细胞系分化的命运，使脂肪细胞转化分化成为肌细胞。但是从纤维母细胞或从其他类型细胞分离的 DNA 不能引起这种细胞分化表型的改变。这是因为肌母细胞的基因组 DNA 中有一种特异性 *MyoD 1* 基因，其 cDNA 称为肌母细胞决定子 1(myoblast determination 1)或 *MyoD 1*。*MyoD 1* 基因仅在肌细胞中表达，它是肌细胞分化主要的开关基因，如果将 *MyoD 1* 基因克隆到一种病毒载体上可以使多种类型的细胞转分化。在病毒启动子的控制下 *MyoD 1* 基因可以表达，进而使其他类型的细胞，如色素细胞、神经细胞、脂肪细胞和肝细胞等转分化为肌细胞。*MyoD 1* 具有肌细胞分化表型特异性控制基因的功能。Hopwood 等(1989)激活非洲爪蟾 *MyoD 1* 基因表达，再用同位素标记的 *MyoD 1* cDNA 进行原位杂交实验，发现 *MyoD 1* mRNA 在爪蟾原肠胚预定形成中胚层的区域特异性积累。到神经胚期在体节、骨骼肌和其他区域，如肢芽原基的位置检测到 *MyoD 1* mRNA 的表

达。小鼠 *MyoD 1* 基因的表达图式与爪蟾相似。

MyoD 1 编码一种核 DNA 结合蛋白，后者能够与 DNA 中肌肉特异性基因的邻近片段结合并激活这些基因。例如 MyoD1 蛋白可以通过与肌氨酸磷酸激酶基因上游结合，直接激活这种肌肉特异性基因的表达。同样，在鸡肌肉乙酰胆碱受体 α 亚单位基因的附近 DNA 链上有两个 MyoD1 的结合位点。*MyoD 1* 也能被自己的蛋白质产物 MyoD1 直接激活，一旦 *MyoD 1* 基因被激活，MyoD1 与 *MyoD 1* 基因上游结合使该基因维持开放。在另一些情况下 MyoD1 的影响也可以是间接的，并不是所有与肌肉细胞表型分化相关的基因都可以直接被 MyoD1 蛋白激活。MyoD1 可能主要通过其他的调节基因间接地激活肌肉特异性结构基因的表达。在这些其他的调节基因中有一种是生肌蛋白基因（*myogenin*）。生肌蛋白 mRNA 的合成在终末分化的肌管阶段才能检测到。具有转录活性的 *MyoD 1* 基因能够使纤维母细胞和其他细胞转分化成为肌细胞。在肌母细胞中生肌蛋白 mRNA 的含量很低，到肌管形成阶段生肌蛋白 mRNA 大量合成，随着肌管分化生肌蛋白 mRNA 逐渐被消耗。*MyoD1* 的表达导致生肌蛋白基因表达，同时生肌蛋白 cDNA 又对于 *MyoD 1* 基因转分化的作用产生影响，所以这里存在一个反馈机制。当生肌蛋白基因和 *MyoD 1* 基因都具有活性时，其他的肌肉细胞分化相关基因也有活性。小鼠生肌蛋白 mRNA 在 *MyoD 1* 转录之前 2 d 的体节中积累，显示这两种肌肉特异性调节因子在肌肉的分化过程中可能发挥不同的作用。

第三节 差异基因转录的调控机制

在不同表型的细胞之间存在差异基因表达，差异基因转录是差异基因表达最基本的调控机制。差异基因转录必然涉及许多因子，并且涉及这些因子在有些细胞中与 DNA 特异区域的结合，以及因此所引起的对 DNA 的限定和 DNA 的变异，而在另一些细胞中却不出现上述情况。为了便于讨论细胞分化中差异基因转录的机制，我们必须涉及真核生物基因的结构。

一、外显子与内含子

基因(gene)是能够产生一条多肽链或者功能性 RNA 所必需的核苷酸序列。真核生物的基因主要由两种 DNA 序列组成：一种是蛋白质编码序列称为外显子(exon)，另一种是非蛋白质编码序列称为内含子(intron)。编码一个蛋白质的序列常由多个外显子构成，在一个结构基因中这些外显子并不连续排列在一起，而是被长度不等的内含子所间隔，以外显子和内含子镶嵌排列的方式存在。不同基因具有内含子的数目和内含子的长度差异很大。真核生物的基因还包括 5′和 3′末端长度不等的特异性序列，这些序列虽然不编码氨基酸但在基因表达的过程中起重要作用。例如人 β－珠蛋白基因由启动子区、帽子序列、转录起始点、前导序列、镶嵌排列的 3 个外显子和 2 个内含子、翻译终止密码、3′非翻译区组成。

人 β－珠蛋白基因序列可以分为 10 个区域：

1. 启动子区(promoter region)，位于转录起始点上游 －95～－26 bp，由两个上游启动子成分和 TATA 框组成。这个区域负责与 RNA 聚合酶结合，同时与以后的转录启始有关。

2. ACATTG 序列，位于 RNA 的 5′末端，又称为帽子序列(cap sequence)，是转录的起始点。在转录后帽子序列将被修饰，这段序列在不同的基因中有差异。

3. 翻译启始密码 ATG，位于转录起始点后 50 bp 处，在转录的起始点和翻译起始点间这段序列称为前导序列(leader sequence)，其长度在不同基因中差异很大。由前导序列决定翻译的速率。

4. 第一外显子，长 90 bp，编码人 β－珠蛋白的 1～30 个氨基酸。

5. 第一内含子，长 130 bp，是人 β－珠蛋白的非编码序列，但对于 RNA 加工成为 mRNA 并转运到细胞核外具有重要作用。

6. 第二外显子，长 222 bp，编码人 β－珠蛋白的 31～104 个氨基酸。

7. 第二内含子，长 850 bp，也是人 β－珠蛋白的非编码序列。

8. 第三外显子，长 126 bp，编码人 β－珠蛋白的 105～146 个氨基酸。

9. 翻译终止密码 TAA。

10. 3′末端非翻译区，这段序列虽然转录但是并不参与蛋白质的翻译。这个区域包括 AATAAAA 序列，此序列为转录的 RNA 产物在 3′末端增加 200～300 多聚腺苷酸[poly (A)]尾所必需。poly (A)尾插入进 RNA 的位置是在 AAUAA 下游大约 20 bp 处，但是转录继续进行超过 AATAAAA 序列的位置，终止在大约 1 000 bp 处。在 3′末端非翻译区序列中，从 AATAAAA 位点后 600～900 bp 具有增强子功能，对于成体红细胞前体 β－珠蛋白基因适时的且组织特异性的表达是必需的。

β－珠蛋白基因在细胞核内最初的转录产物，即前体 RNA 包含帽子序列、前导序列、外显子、内含子和 3′非翻译区组成(图 17.3)，同时其两末端都已经被修饰。帽子序列位于前体 RNA 5′末端，由 7－甲基鸟嘌呤核苷构成。它的连接方向与 RNA 的其他所有序列的极性相反，也就是说前体 RNA 其他所有碱基之间的连接都是从 5′末端到 3′末端，而在帽子序列中是从 3′末端到 5′末端。这也就意味着细胞核内前体 RNA 中无游离的 5′末端磷酸基团。mRNA 分子同样具有 5′末端帽子，尽管还不清楚是不是前体 RNA 中原来的帽子，帽子序列为 mRNA 结合核糖体和翻译起始点的所必需。

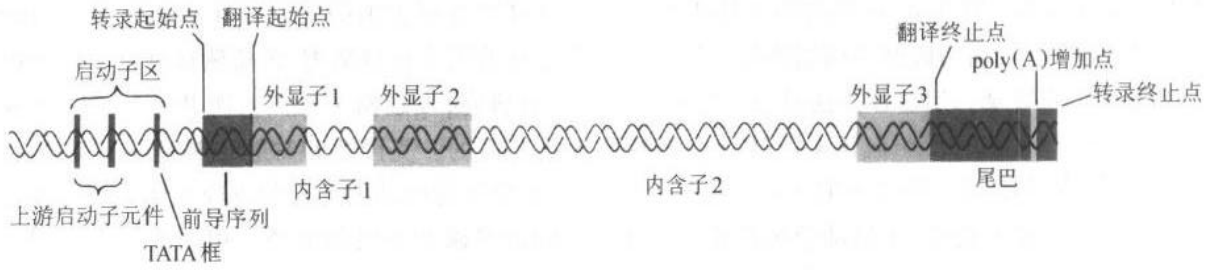


图 17.3　人 β－珠蛋白基因结构示意图

在细胞核内，前体 RNA 的 3′末端通常要增加大约 200 个腺苷酸残基的 poly(A)尾巴。这些腺苷酸残基是通过酶促反应聚合和增加到其转录产物上的。poly(A)尾巴并不属于基因序列的一部分。5′末端和 3′末端被修饰后可保护 RNA 不受外切酶的降解，使前体 RNA 和 mRNA 能稳定存在。形成 mRNA 后 poly(A)尾巴逐渐缩短。新合成的小鼠和兔细胞中的 mRNA 有大约 150 个腺苷酸残基，但是在成熟 mRNA 分子中只有 100、60 或 40 个附加腺苷酸残基。如果把缺乏 poly(A)的珠蛋白 mRNA 注射到爪蟾卵母细胞中将非常迅速地降解。在珠蛋白 mRNA 中具有 poly(A)尾巴的时间可维持 20 h 以上。

内含子不参与 β－珠蛋白的编码，但也是基因很重要的组成部分。因为内含子中包含大量的调节序列，能够调节 DNA 转录的速率，同时还调节 RNA 从细胞核迁移到细胞质中去。例如有一种 β^+－地中海贫血病（β^+－thalassemias）的患者是以 β－珠蛋白低水平表达，仅合成少量的 β－珠蛋白为特征。这种病人并不缺乏编码 β－珠蛋白的基因，由这些基因转录的前体 RNA 也是正常的，但是患者却缺乏细胞质内 β－珠蛋白 mRNA。表明这种患者在 RNA 加工水平的调控上出现了问题，缺乏对于 β－珠蛋白 mRNA 前体完善的加工机制。研究患者的 β－珠蛋白基因序列，发现它们的第一内含子有突变，进一步表明内含子的结构对于将该基因 RNA 的加工和使前体 RNA 迁移到细胞质中去具有重要的意义。另一种 β－地中海贫血病——β^0－地中海贫血病的患者完全不能合成 β－珠蛋白，这是由于启动子（promoter）或增强子（enhancer）突变所致。

二、启动子和增强子

真核生物基因的转录起始和表达是由两种类型调控元件的相互作用进行调控的，一方面是顺式调控元件（cis-regulator），另一方面是反式作用因子（trans-regulatory protein）。启动子和增强子都是顺式调控元件。反式作用因子是可溶性的分子，包括具有调控作用的蛋白因子和 RNA。

（一）启动子的结构与功能

启动子是位于转录起始位点上游的特殊 DNA 序列。它能被 RNA 聚合酶Ⅱ识别和结合，对于决定基因转录起始和保证 DNA 精确、有效的转录具有极其重要作用。转录量相对较大的基因，启动子都具有相似的结构。它们都具有一个保守性较高且富含 TA 的序列，又称为 TATA 框，位于转录起始位点上游大约 30 bp 处。另外在 TATA 框的上游还有一个或多个上游启动子元件（upstream promoter element）如：CCAAT（CAAT 框）、GGGCGGG（GC 序列）、GCCACACCC 和 ATGCAAAT序列。

对启动子区在转录中起特殊作用的首次实验，是利用 β－珠蛋白基因进行的测定。将已克隆的 β－珠蛋白基因注射进蛙卵的细胞核或成纤维母细胞核中可以正确进行转录。将 β－珠蛋白基因与纯化的 RNA 聚合酶、核苷酸和核基质共同孵育也可以进行正确的转录。在确定该基因可转录的体外体系中，利用限制性内切酶使基因中或基因邻近的某个区域缺失，再检测被修饰后的基因是否能够正确转录。用这种方法对 β－珠蛋白基因进行研究，发现帽子位点上游开始的 109 个碱基对，对于 RNA 聚合酶引起该基因转录的正确起始是必需的。克隆小鼠珠蛋白基因转录起始点上游－106 位点到第一外显子的＋475 位点间的序列，然后对这些基因片段的克隆在体外培养体系中进行特定碱基对诱变，于启动子区共获得 130 种不同的单碱基替换的克隆。用这些克隆构建一种重组表达质粒，这种质粒含有在所有组织中都表达的增强子。再将这些重组质粒转入通常不表达珠蛋白的培养细胞，检查其转录的情况。在多数情况下，5′末端一侧的单碱基突变不影响珠蛋白基因的有效转录，但是有三簇核苷酸的突变会明显地减少转录，第一簇在 TATA 框内，其次是上游启动子元件 CAAT 框和 CACCC 区域。

TATA 框的主要作用是使转录精确地从起始位点开始，其他的上游启动子元件主要控制转录起始频率和维持基因转录，特别是 CAAT 框的作用相对较大。CAAT 框和 TATA 框在许多基因的启动子中都是很关键的元件。在有些基因中，这几种启动子元件不一定都存在，如 CACCC 序列仅发现于几种动物和人的 β－珠蛋白基因，位于帽子的上游 95～87 bp 的序列中。对于人 β－珠蛋白基因的转录是很重要的调控元件，如果这个序列中有碱基发生自然突变，可以引起 β－珠蛋白基因

转录能力的完全失去。

将DNA转录成为RNA，除了DNA中必须有一些特异性序列之外，细胞核内还必须存在一些转录因子(transcription factor)，这些转录因子能够精确地找到包裹在核小体内DNA上的特殊序列。目前认为表明一个基因具有转录能力，必须涉及到转录因子与DNA结合和基因启动子区域不受核小体的限制。由于特异性转录因子与DNA的相互作用和结合，导致基因转录的组织特异性和时间特异性。

(二) 与启动子结合的反式作用因子

1. 转录起始复合物的形成

绝大多数真核生物的细胞有三种类型RNA聚合酶，即RNA聚合酶Ⅰ、RNA聚合酶Ⅱ和RNA聚合酶Ⅲ。RNA聚合酶Ⅱ负责作用于多种基因的转录。但在其他细胞核因子缺乏的情况下，纯化RNA聚合酶Ⅱ并不能识别启动子序列，转录只能起始于任意位置。实际上即使将克隆的基因与纯化RNA聚合酶Ⅱ和三磷酸核苷酸共孵育也不能进行转录，但是，如果在此体系中加入细胞核的提取物即开始正确的转录。说明细胞核的提取物中存在一些因子是RNA聚合酶与启动子结合所必需的。与启动子结合，控制基因转录开始的转录因子又称为转录调节蛋白。

从不同动物组织和胚胎，甚至从酵母细胞分离的普通转录因子具有相似的活性。普通转录因子负责识别启动子序列中TATA框，并与RNA聚合酶Ⅱ一起形成转录起始复合物，进而起始转录。目前许多编码普通转录因子的基因已经克隆，序列分析显示它们之间有较高的保守性。经过鉴定的普通转录因子已有多种，如TFⅡD，TFⅡB，TFⅡA，TFⅡF等。这些转录因子在形成转录起始复合物的过程中是按一定的顺序进行的。由于TFⅡD是个多聚体分子，含有一个TATA框结合蛋白TBP，首先由TFⅡD通过TBP识别启动子序列中TATA框并与之结合。第二步是TFⅡA结合上去，形成TFⅡD－TFⅡA－启动子复合物，以防止抑制因子的作用。同时TFⅡF与RNA聚合酶Ⅱ先形成复合物，下一步再与有TFⅡB加入的启动子复合物结合。以后随着其他的因子再逐渐加入，共同组装形成一个大转录起始复合物(图17.4)。这些因子中有的具有DNA解旋酶活性，有的因子具有蛋白激酶活性，在这些因子的协同作用下，同时有ATP存在，被磷酸化的RNA聚合酶Ⅱ即可起作用，使转录起始进行。RNA聚合酶Ⅰ和RNA聚合酶Ⅲ作用的基因转录也有多个转录因子参与，这些转录因子也必须与启动子结合。

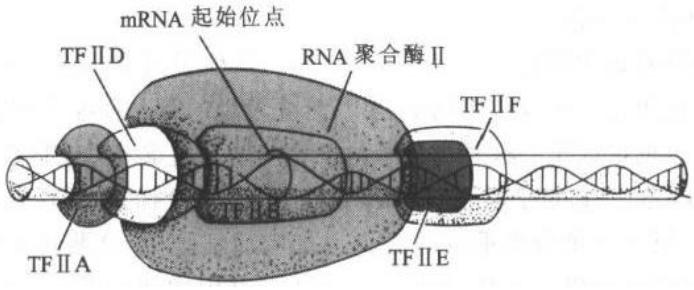


图17.4　真核细胞转录起始复合物结构示意图

2. 与启动子结合的非特异性反式作用因子和特异性反式作用因子

在许多基因转录中存在其他一些与启动子结合的反式作用因子。这些蛋白调节转录必须直接

或间接作用于 TATA 框的转录起始位点。同时核蛋白 CTF 必须与 CAAT 上游启动子元件结合，该蛋白质的末端氨基酸能够识别 CAAT 元件，但是需要富含脯氨酸的羧基端激活转录。Sp1 蛋白通过其羧基端锌指区专一性地与 GGGCGG 序列结合，再由其氨基端调节转录活性。这些因子在所有的细胞中可能都存在，但它们并不能调节其他基因的表达，可能涉及启动子区域和增强子区域的相互作用，进而引起一些特定细胞中特异性基因的不同转录。

在有些细胞中，同一顺式调节元件能被一个以上的反式作用因子结合。CAAT 上游启动子元件在不同的细胞中可以被不同的蛋白质识别，它们之间的相互作用也可以刺激转录，如肝特异性核蛋白 C/EPB 与 CAAT 元件结合能激活肝特异性基因转录。事实上，任何发育调节基因的启动子都既有非组织特异性的启动子元件，又有组织特异性启动子元件。β－珠蛋白基因的 CAAT 元件既可以被非特异性反式作用因子识别，它的 CAC 元件又可以被红细胞特异性蛋白所识别，此外在转录起始点上游 120～200 bp 也有两个启动子位点与红细胞特异性蛋白 NF－E1 结合，大约在－150 bp 附近的 DNA 序列是非特异性核蛋白 CP1 结合区。用培养红细胞诱导 β－珠蛋白的合成时，－150 bp 位点和 NF－E1 结合位点十分重要，但是这些元件都不能够单独地直接引起转录。特异性的和非特异性反式作用因子之间有协同作用。

启动子的功能不仅能够与 RNA 聚合酶结合，而且与该基因在特定发育时期和特定组织表达有关。后一种功能可以通过有些转基因动物来说明。我们可以构建一种新基因，用其他基因的启动子替代原来的启动子，再把构建的融合基因转入哺乳动物合子的原核中去表达。小鼠 *MT－1* 基因编码一种小分子金属硫蛋白，其功能是调节血清锌的水平。*MT－1* 基因可以被锌、镉等重金属诱导转录，而负责诱导的序列就是 *MT－1* 基因的启动子。如果用 *MT－1* 基因的启动子取代大鼠生长激素基因原来的启动子。这种融合基因由于受 *MT－1* 基因启动子的控制，在重金属的诱导下可以启动大鼠生长激素(rGH)mRNA 的转录。用细菌扩增含有融合基因的质粒，经过分离、纯化 *MT－1/rGH* 数百个基因片段，再分别注射进一些小鼠合子的原核之中。这些合子发育而获得的新生小鼠，经核酸分子杂交检测，证明染色体上插入了许多大鼠生长激素基因的拷贝。在饲养这些转基因小鼠的食物中加入锌，可以诱导它们的肝脏合成大量大鼠的生长激素。这是由于 *MT－1* 基因启动子对转基因小鼠作用的结果。在正常情况下，肝脏是合成金属硫蛋白的组织，而生长激素是脑垂体的分泌产物。由于生长激素的大量合成，转基因小鼠的躯体可比正常小鼠大 80% 以上。

（三）增强子的结构与功能

增强子是另一类具有顺式调控作用的 DNA 序列。增强子最早发现于病毒，以后知道增强子广泛地存在于所有真核生物。在真核生物基因中，首先发现的是一种控制细胞特异性免疫的基因，即免疫球蛋白基因转录的增强子。这种增强子位于免疫球蛋白重链可变区基因和恒定区基因之间的内含子序列内(图 17.5)。它对于 B 淋巴细胞免疫球蛋白基因的特异性转录是必需的。如果将免疫球蛋白重链基因，转入不能合成重链的 B 淋巴细胞瘤细胞中，这些转化的细胞可利用插入的重链基因，合成免疫球蛋白重链。但是，如果转入的重链基因中缺少那一小段内含子序列，转化细胞合成免疫球蛋白重链的量就大大减少或者缺乏免疫球蛋白重链。以后的研究表明，增强子对于正常发育的调节是非常重要的。事实上大多数基因的转录都需要增强子。增强子在决定差别基因转录的时间和组织特异性方面起重要作用，也就是说增强子与调节基因按一定的时间和空间表达密切相关。一般认为转录过程的调节，决定于增强子上结合的蛋白质与启动子上组装的转录复合

物的相互作用。

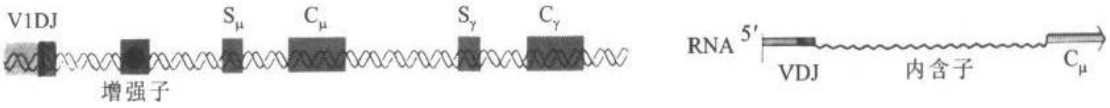


图 17.5　免疫球蛋白基因增强子位于重链可变区基因和恒定区基因之间的内含子序列内

增强子有激活启动子的功能，能控制特异性启动子转录的效率和速率。增强子可以与启动子相隔很远的序列起作用，因此它可以位于基因的 3′末端，内含子区域，甚至在互补的 DNA 链中。当增强子与启动子相隔较远时，决定基因转录的信号常有多个。一个基因可以与几个增强子相连，每个增强子也可以与几个因子相结合。增强子也可以与特定的反式作用因子、转录因子结合而发挥作用。增强子中有一类对基因的转录起抑制作用，称为沉默子(silencer)。当转录因子与沉默子结合时可抑制顺式调控元件相连的启动子的转录。同一增强子在有的细胞中是顺式调控元件，但在其他细胞中可能是沉默子，这是由细胞中其他的转录因子决定的。

由于增强子中有的能够调节基因表达的时间，有的能够调节基因表达的组织和细胞特异性，有的具有前述两种功能，还有的增强子与激素或其他分子相关，根据增强子的功能特征可以将其分为以下几类。

1. 时间特异性增强子

在胚胎发育的过程中存在一种时间特异性增强子。两栖类胚胎发育中存在最典型的基因活性的时间开关，即囊胚中期转换(midblastula transition，MBT)。MBT 类型的基因由于含有一种时间特异性增强子，在囊胚中期被特异性激活。两栖类的这种增强子位于 MBT 基因阅读框 5′末端上游约 700 bp，人 β－珠蛋白基因也有自己的时间特异性增强子，位于 3′末端，AATAAA 序列下游 600～900 bp 之间。如果把包含这个区域的 DNA 片段，移到 γ－珠蛋白基因的附近，γ－珠蛋白基因通常是在人胚胎时期转录，但在 β－珠蛋白基因的时间特异性增强子的作用下，也可以在成体时期进行表达。此增强子包含四个红细胞系特异性 NF－E1 转录因子的结合区。

2. 组织特异性增强子

调节 β－珠蛋白基因表达的增强子，除了 3′末端的临时特异性增强子之外，还有其他两种增强子，由它们调节 β－珠蛋白基因表达的组织特异性。其中一种增强子位于 β－珠蛋白基因的第三个内含子序列内，其作用使 β－珠蛋白基因的转录只能在红细胞发生。另一种增强子事实上是个“主”增强子，所有位于第 11 号染色体上的人 β－珠蛋白基因家族(ε－，γ－，β－和 δ－珠蛋白基因)的转录都由它控制。如果这个增强子区域缺失会引起所有 β－珠蛋白基因家族的基因沉默。相反，如果将这个增强子插入到红细胞通常不表达的基因旁边，例如将其插入到 T 淋巴细胞特异性 *thy－1* 基因旁，再将后者转移进红细胞的前体，结果 *thy－1* 基因可以在这些红细胞中表达。当然，这种影响对于红细胞前体是特异性的，因为只有红细胞的前体细胞中存在能与这个增强子区结合的转录调节因子。“主”增强子的功能可能是使整个转录调节因子区域打开。

3. 胰腺增强子

增强子能对基因表达的时间特异性和组织特异性进行不同的调节。有时基因的活性在不同类型的相邻细胞中由不同的增强子所控制。例如胰腺外分泌蛋白如胰凝乳蛋白酶、淀粉酶、胰蛋白酶

基因的增强子，与内分泌蛋白如胰岛素基因的增强子，虽然都位于各自基因5′末端旁的序列中，却是不相同的两类增强子。利用报道基因可对某一特定增强子的功能进行研究。氯霉素乙酰转移酶基因(*CAT*)的活性很容易检测，同时在哺乳动物中不表达，可作为哺乳动物的报道基因。Walker等(1983)分别构建这些基因5′末端旁序列和 *CAT* 的融合基因，再将不同的融合基因分别转入三种受体细胞：不产生胰岛素和胰凝乳蛋白酶的卵巢细胞、分泌胰岛素的胰腺细胞系和另一种产生外分泌蛋白的胰腺细胞系，然后检测各种细胞中氯霉素乙酰转移酶的活性。结果在卵巢细胞中两种5′末端旁序列都不能调节 *CAT* 表达；在分泌胰岛素的胰腺细胞中，胰岛素基因5′末端旁序列可以调节 *CAT* 表达，但是胰凝乳蛋白酶基因5′末端旁序列却没有此活性；与此相反，在外分泌的胰腺细胞中，胰凝乳蛋白酶基因5′末端旁序列可调节 *CAT* 表达，胰岛素基因5′末端旁序列无此活性。说明胰腺外分泌细胞和内分泌细胞的基因表达由不同的增强子控制。

4. 卵黄蛋白增强子

果蝇卵黄蛋白是在雌性成体果蝇的特殊细胞中才大量合成的一种蛋白。果蝇有两种卵黄蛋白基因，*yp 1* 和 *yp 2*，它们在DNA上的位置邻近但是转录的方向相反(图17.6)。在卵巢和脂肪体中卵黄蛋白基因都转录，但是它们能用限制性内切酶分解，在共同的5′末端分开。如果将这两种基因分别与报道基因一起克隆到能插入果蝇基因组的表达质粒，再导入果蝇DNA，可以检测到它们的转录有性别和时间的特异性。卵黄蛋白基因仅在成体的雌性果蝇中表达。同时 *yp 2* 的mRNA只能在卵巢能测到，而 *yp 1* 的mRNA只能在脂肪体中能测到。这说明卵黄蛋白基因有两个增强子，而且都位于5′末端，一个是负责在卵巢里的转录，而另一个则是负责在脂肪体中的转录，所以两个基因在两种细胞中都能正常转录。如果用限制性内切酶把两种增强子所在的序列切下来，再使 *yp 1* 与脂肪体特异性增强子结合，*yp 2* 与卵巢特异性增强子结合，结果也能分别发生脂肪体和卵巢细胞中的特异性转录。也就是说不管哪个基因，只要与脂肪体特异性增强子靠近，就能进行脂肪体中特异性转录；只要与卵巢特异性增强子接近，就能进行卵巢细胞中的特异性表达。增强子对于基因表达的特异性有决定性的作用。

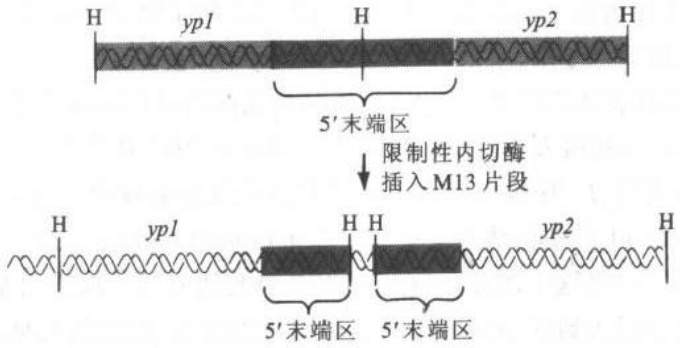


图17.6 控制果蝇卵黄蛋白组织特异性转录的增强子

用限制性内切酶 *Hind* Ⅲ酶解并插入M13片段，在共同的5′末端可分开，成为两个不同基因的增强子

三、转录因子

转录因子(transcription factor)是基因调控的反式作用因子，是能与启动子和增强子结合的蛋

白质。由于它们的相互作用使任何一种细胞中只有很少的一部分启动子发生转录。转录因子既含有特异性 DNA 结合域，又含有能与启动子或增强子结合并刺激基因转录的结构域。转录因子可分为通用转录因子(general transcription factor)和特殊转录因子，即两类基因调节蛋白。通用转录因子是指与启动子 TATA 框序列结合的蛋白质，它们与 RNA 聚合酶Ⅱ共同组装成为转录启始复合物，以启动转录。在基因转录调控中除了需要通用转录因子之外，还需要其他一些与顺式作用元件中 DNA 调节序列结合的转录调节因子。它们有的能识别特殊的 DNA 调节序列并能与其结合，有的与 RNA 聚合酶和其他转录因子结合以行使它们的功能。真核生物有多种结构模式的转录因子 DNA 结构域，如 α 螺旋－转角－α 螺旋模式、锌指型模式、亮氨酸拉链结构模式和螺旋－环－螺旋模式等。这些结构域与特异性 DNA 序列结合并起作用。

现已发现的转录因子有数百种，一部分转录因子的作用是激活基因转录，而另一部分转录因子却是基因的阻遏蛋白。下面讨论几种主要的反式作用因子(trans-regulatory factor)。

1. 同源异型框蛋白(homeobox protein)

同源异型框蛋白是一类很重要的反式调节因子。最初发现的同源异型蛋白与果蝇胚胎分节特异性相关，它们的突变可使身体的一部分结构转变成为相似或相关的另一部分结构，即产生同源异型现象(homeosis)，产生这种现象的突变称为同源异型突变(homeotic mutation)，导致同源异型突变的基因称为同源异型基因(homeotic gene)。同源异型基因都具有同源异型框(homeobox)序列，但是含有同源异型框的基因除了同源异型基因之外，还有一些不产生同源异型现象的基因，统称为同源异型框基因(homeobox gene)。同源异型框在进化上十分保守且广泛地存在于真核生物调节基因中，其生物学意义是极其重要的。在果蝇中，同源异型框基因几乎参与了胚胎早期发育的一切事件。同源异型框编码 60 个氨基酸残基的同源异型结构域(homeodomain)。核磁共振和晶体学的研究表明同源异型结构域可排列呈 α 螺旋－转角－α 螺旋模式，近羧基端的 α 螺旋可延伸到所识别的 DNA 双螺旋的主沟内结合，而氨基端与 DNA 的小沟结合。通过与靶基因调控序列相结合以及与转录因子相互作用而影响靶基因转录。同源异型框基因在动物早期胚胎发育中的表达具有很强的时空和组织特异性，同源异型框蛋白对特定启动子的识别对于动物早期发育的调控至关重要，例如果蝇母体效应基因 *bicoid*，其编码蛋白是一种前端决定子。在卵细胞发生过程中，*bicoid* 基因在营养细胞内转录成为 mRNA，然后被转运到卵细胞预定前端。受精后，迅速翻译的 BICOID 蛋白在前端快速积累并向后端扩散，形成一定的浓度梯度。因同源异型框蛋白 BICOID 是个转录因子，当它与 *hunchback* 基因的启动子结合时，可激活 *hunchback* 基因的转录。*hunchback* 基因表达的产物 HUNCHBACK 蛋白也是一种转录因子，可与果蝇头、胸部形成相关基因的启动子结合，激活后者的转录。它们在决定胚胎前后轴的发育中起着重要的作用。这些同源异型蛋白的 DNA 结合位点的氨基酸残基如果发生改变，将会影响对 DNA 序列的识别。

同源异型框基因的结构复杂，也具有复杂的基因表达的调控模式，有些同源异型框基因有多个启动子、多个转录启始位点和多个内含子，有些同源异型框基因可通过不同的 RNA 剪接方式产生相关蛋白。果蝇主要的同源异型蛋白及其 DNA 结合位点见表 17.2。

2. POU 蛋白

有些转录因子除了具有同源异型结构域之外还有第二个 DNA 结合区。由同源异型结构域和第二个 DNA 结合区，即 POU 特异性片段以及它们之间的一段非保守序列，共同构成 POU 结构域(pronounced "pow" domain)(图 17.7)。具有 POU 结构域的蛋白质称为 POU 蛋白(POU protein)，

表 17.2 果蝇主要的同源异型蛋白及其 DNA 结合位点

蛋 白 质	DNA 结合位点	蛋 白 质	DNA 结合位点
abdominal B	TAATTTGCAT	Fushi tarazu	TCAATTAAAT
	TCAATTAAAT		TAATAATAATAATAA
antennapedia	TAATAATAATAATAA	paired	TCAATTAAAT
bicoid	TCCTAATCCC	ultrabithorax	TAATAATAATAATAA
engrailed	TCAATTAAAT	zerknult	TCAATTAAAT
even-skipped	TCAATTAAAT		
	TAATAATAATAATAA		
	TCAGCACCG		

如 PIT－1、OCT－1、OCT－2 和 UNC－86 等。PIT－1 是一种垂体特异性因子，可激活生长激素基因、催乳素基因和其他垂体蛋白基因；OCT－1 是各种组织普遍存在的蛋白，能够识别其他基因中的 Octa box 序列；OCT－2 是 B 细胞特异性蛋白，能够识别 Octa box 序列和免疫球蛋白基因；*unc－86* 是线虫神经细胞决定相关基因。PIT－1 的同源异型结构域识别 ATATTCAT 序列，OCT－2 识别相似的 ATTTGCAT 序列，如果 PIT－1 识别的 DNA 序列中有两个位点发生突变，就可能变成 OCT－2 结合区，使淋巴细胞可表达垂体基因。也就是说在 POU 因子结合位点中两个碱基的变化，可使垂体特异性转录变成淋巴样特异性转录。

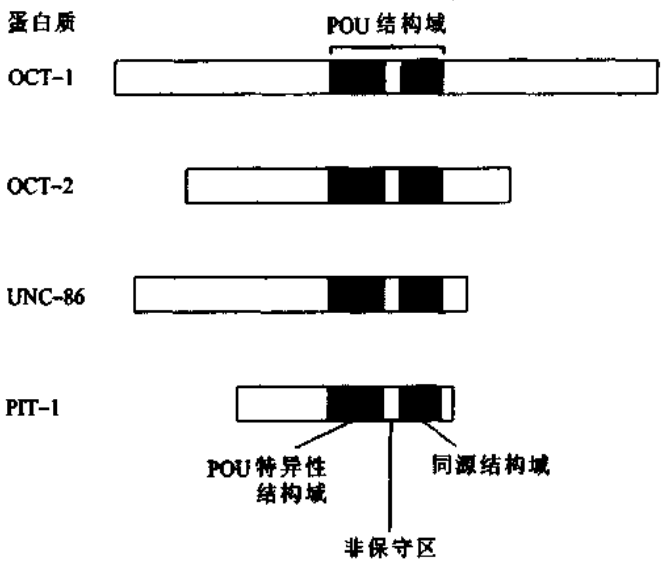


图 17.7 POU 结构域示意图及 POU 结构域在 POU 蛋白中的位置

PIT－1(GHF1)是了解得比较清楚的增强子结合蛋白。这是一种在腺垂体细胞中才表达的特异性蛋白质。足迹法(footprinting)显示 PIT－1 与人生长激素基因上游启动子成分的两个位点结合。在体外实验体系中，如果把克隆的生长激素基因放在非垂体细胞的核基质中不转录，而将生长激素基因放在腺垂体细胞的核基质中时转录发生。但是增加了 PIT－1 的非垂体细胞的核基质却能使生长激素基因表达。看来，生长激素基因在垂体前部细胞中的特异性表达由组织特异性启动

子结合蛋白介导。如果将外源性基因克隆到 PIT－1 结合序列旁，再一起导入小鼠的基因组，可检测到垂体特异性转录产物。PIT－1 增强子结合蛋白是由其自身的发育来进行调节。在腺垂体的原基，Rathke's pouch 能在组织学切片中观察到的第一天，小鼠 *Pit－1* 基因的转录就能够检测到，但是一直到以后 2～3 天 PIT－1 蛋白质并未测到。在垂体中 *Pit－1* 基因的表达是很有趣的，在合成促肾上腺皮质激素（ACTH）和促性激素的垂体细胞中，*Pit－1* 的 mRNA 合成后并不翻译。但是，在垂体前部另外三种细胞中 *Pit－1* 的 mRNA 翻译成 DNA 结合核蛋白。这三种细胞是合成生长激素的细胞、产生催乳素的细胞和合成促甲状腺激素的细胞。生长激素基因的转录直接受 PIT－1 的控制，催乳素基因在妊娠期由于 PIT－1 和孕酮的共同作用而表达，进而刺激乳汁产生。PIT－1 和孕酮为激活催乳素基因增强子的不同区域所必需，PIT－1 与催乳素基因增强子的一个区域结合，孕酮通过其受体与增强子的另一个区域结合。这些因子协同作用比单独作用时基因的活性明显升高。同时在这种情况下，增强子结合因子的协同作用，能够精确地将器官特异性转录调控机制转变成为细胞类型特异性转录调控机制（图 17.8）。

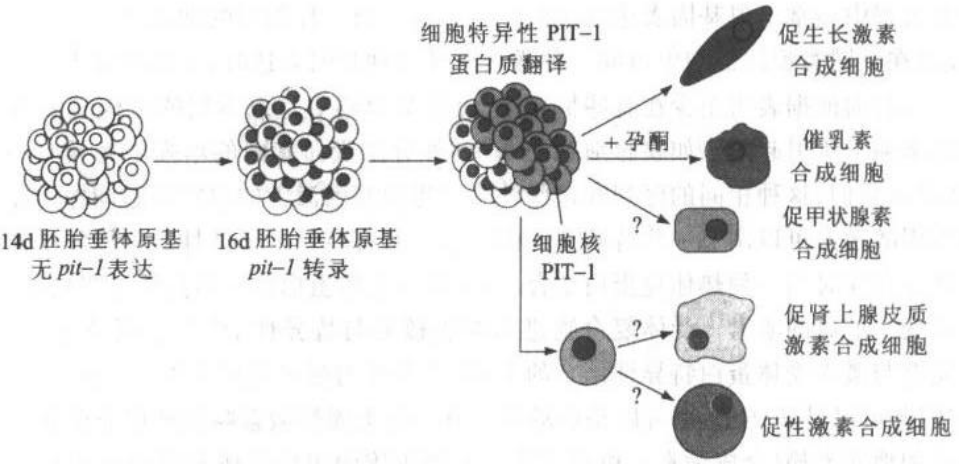


图 17.8　通过反式调节蛋白的协同作用决定细胞分化的命运

小鼠 *Pit－1* 基因在垂体前部各种细胞中转录，但 PIT－1 蛋白质的翻译只发生在合成促生长激素细胞、产生催乳素细胞和合成促甲状腺激素细胞中。随着 PIT－1 的合成，促生长激素合成细胞翻译生长激素。催乳素细胞在 PIT－1 和雌性激素的共同作用下，大量合成催乳素及其反式调控受体蛋白。促性激素基因的转录调控机制还涉及沉默子区的作用

PIT－1 对于催乳素基因的作用说明了许多转录因子的特点，它们可通过与其他转录因子的协同作用来调节靶基因的活性。催乳素基因的增强子上可以结合许多不同的因子，这些因子之间相互作用并调节催乳素基因的转录，催乳素基因只有在妊娠期需要刺激乳汁生成时才被激活，在 PIT－1 和孕酮共同作用下该基因的表达达到最高活性水平。这种增强子结合因子的协同作用，既可以调节催乳素合成发生在特异性细胞之中，又可以调节催乳素合成发生在妊娠后较短的时间。在催乳素合成的细胞中，催乳素基因增强子旁还有一个沉默子序列，可以关闭催乳素基因。此外，催乳素基因的启动子和增强子之间存在协同作用。这种作用是通过启动子和增强子位点之间的环状结构实现的。大鼠的催乳素基因增强子位于启动子上游 1 300 bp 以外，通过蛋白质与蛋白质的相互作用使 DNA 结合。但是启动子和增强子位点之间的环状结构只有在 PIT－1 和孕酮同时存在

时才能形成,这是因为增强子结合蛋白 PIT－1 和孕酮受体与启动子上的转录启始复合物相互作用,使启动子和增强子结合在一起。结合在增强子上的雌性激素的受体可以稳定启动子和增强子区的相互作用。

PIT－1 蛋白对其自身合成有调节作用,因为 *Pit－1* 基因的一个增强子就是 PIT－1 蛋白的靶位点,当该基因被其他转录因子激活时,PIT－1 蛋白就结合在自己的增强子上维持 *Pit－1* 基因的转录。这类正反馈自调节机制具有非常重要的意义,可以使发育按既定方向进行。因此,*Pit－1* 基因一旦被激活,就可以保持垂体表现型。基因表达的自调节机制还见于肌肉特异性分化基因 *MyoD*,果蝇的性别控制基因和体节特异性基因的表达。PIT－1 增强子结合蛋白不仅介导这些细胞中差异产物的转录,而且为腺垂体细胞在 Rathke's pouch 里的分化所必需。小鼠的侏儒突变是由 PIT－1 蛋白的突变引起的,这种突变鼠的垂体前部缺乏促生长激素合成细胞、产生催乳素的细胞和促甲状腺激素的细胞。

四、激素应答成分

在发育过程中经常出现基因表达的协同调节现象。当一种类型的细胞同时表达几种细胞特异性蛋白,或者在不同类型的细胞中由同一种激素诱导几种基因表达时,这种基因表达的协同调节现象即发生。已有的证据表明至少在有些情况下,协同基因调节是由不同的结构基因连在一起或者具有相似的增强子所引起的。如胰腺细胞的 10 种外分泌蛋白基因的增强子都具有 20 bp 的相同序列,这就提示我们,这种相同的序列在这些外分泌蛋白基因激活的过程中起同样的作用。

已知类固醇激素可以调节一些特殊基因的转录。具有转录因子活性的类固醇激素特异性受体以非活性状态存在时与一种热休克蛋白结合,当激素与受体蛋白结合后热休克蛋白脱离,同时受体构象发生改变。形成的激素－受体复合物进入细胞核并与特异性 DNA 序列结合,激活启动子调节转录。能够与激素受体蛋白特异性结合的 DNA 序列称为激素效应元件(hormone-responsive elements),它们既可以是增强子,也可以是启动子。有一类类固醇激素叫做糖皮质激素,包括可的松、氢化可的松和地塞米松(合成激素),可调节所有类型细胞的蛋白代谢和减少组织的纤维化。包括哺乳动物金属硫蛋白基因在内的几种基因能够被糖皮质激素激活,这是因为这些基因中存在与糖皮质激素反应的 DNA 序列,又称为糖皮质激素效应元件。当糖皮质激素受体与这些效应元件结合时就能对增强子起作用。如果将糖皮质激素效应元件捆绑到激素不依赖的基因上,结果该基因也能对糖皮质激素起反应。

各种基因的类固醇激素效应元件非常相似,而且它们由一类非常相似的蛋白质识别。比较这些类固醇激素受体蛋白的一级序列,发现都具有以下三个功能结构域:激素结合结构域(hormone-binding domain),同源性很高且能识别激素效应元件的 DNA 结合结构域(DNA binding domain)和反式激活结构域(transactivation domain),后者涉及信号传导和转录的起始。它们的功能可以互相重叠。这种转录激活的方式比较特殊,所有的功能结构域都要发挥作用,同时为转录激活事件发生,受体必须与激素结合蛋白一起进入细胞核和发生变构。值得说明的是,激素与第一个功能结构域的结合,对于蛋白质变构和识别激素效应元件的 DNA 结合结构域的能力是必需的。受体蛋白与激素效应增强子元件的结合是通过 DNA 结合结构域内的锌指结构来完成的。激素对基因转录既可以进行正调控又可以进行负调控,激素受体在进行正调控和负调控时起作用的结构域不同。例如,当糖皮质激素进行正调控时激素结合结构域和 DNA 结合结构域,以及 N 末端是必需的,但

是在进行负调控时却不需要 N 末端，对 DNA 结合结构域的要求不完全相同。此外负调控也可不通过受体蛋白与 DNA 直接作用，而通过与其他蛋白的相互作用来实现。

五、免疫球蛋白轻链基因的转录调控

利用保持在某特定发育阶段的克隆细胞系，使我们能够分析该发育阶段存在的转录因子。这些克隆是通过一些肿瘤细胞而获得的。研究免疫系统的 B 淋巴细胞白血病的克隆细胞系，使科学家们能够认识许多 B 淋巴细胞发育必需的顺式和反式转录调节因子。

1．免疫球蛋白基因的结构

在每一个体中，绝大多数类型的细胞都具有相同的基因组，但是淋巴细胞例外。由于基因重排，使每一种 B 淋巴细胞只能产生一种抗体。我们人体的抗体库可能具有 10^7 种以上不同的抗体分子。当外来抗原与淋巴结或脾脏中的淋巴细胞接触时就可以产生抗体。事实上在与抗原接触之前，处于休止期的 B 淋巴细胞就能够合成免疫球蛋白分子，但并不分泌，而是将这些免疫球蛋白分子插入 B 淋巴细胞的质膜作为抗原受体。这些受体在与抗原结合时通过信号传导调控基因表达，使细胞分裂和进一步分化。每一种 B 淋巴细胞产生一种抗体，这种抗体也只能识别一种抗原。因此，识别脊髓灰质炎病毒外壳蛋白的抗体并不能识别大肠杆菌膜蛋白或霍乱毒素。所有 B 淋巴细胞膜上的抗体蛋白分子都有非常相似的结构。如第十五章所述，每个抗体分子都具有两对多肽链，即两条相同的重链和两条相同的轻链，重链和轻链都由类似的称为功能区的结构片段组成，链与链之间由二硫键连接(图 15.5)。

2．抗体轻链基因的产生

抗体的重链和轻链基因都是由多个片段构成。哺乳动物轻链基因由 V、J、C 三个基因片段构成。在 B 淋巴细胞分化过程中通过基因重排，V、J 先结合形成抗体轻链基因的可变区，再由一个编码轻链可变区的基因片段和一个编码恒定区的基因片段融合形成一个轻链基因。

3．抗体重链基因的产生

抗体重链基因比轻链基因含有更多 DNA 片段。重链基因包括编码可变区的 V 片段 D 片段、J 片段以及编码重链基因恒定区的 C 片段。重链可变区基因的形成是一个 V 片段和一个 D 片段结合，再与一个 J 片段结合，共同组成编码重链可变区的 DNA 序列。结合在一起的 VDJ 可变区的 DNA 序列与其邻近的第一个重链恒定区的基因区 C_μ 片段连接，C_μ 片段所编码的重链恒定区对于抗体分子插入到细胞表面质膜上具有特别重要的意义。所以，在 B 淋巴细胞不依赖抗原的发育时期，免疫球蛋白分子由两个基因编码。大约形成 10^3 个轻链基因和 10^4 个重链基因，因为每个基因的产生是独立的，所以在一个细胞中轻链和重链基因合起来同时可具有产生 10^7 种抗体的能力。但是事实上，每个细胞仅仅只合成 10^7 种中的一种抗体分子，并且将其置于细胞膜表面作为抗原受体。每个淋巴细胞克隆的基因组与其他细胞明显不同。

在以后的成熟发育中，有些 B 淋巴细胞经历另一个称为类型转换(class switching)的基因重排，使整个重链可变区 VDJ 基因序列从 C_μ 片段旁移到其他的 C 区片段旁。新的 C 片段的性质也存在一定的差异。例如 VDJ 基因序列移到 C_α 片段旁，由 C_α 序列所编码的恒定区使抗体能够分泌到黏膜和消化系统中，有利于机体抵御空气和食物抗原。由于免疫球蛋白可变区基因重排和恒定区基因的类型转换机制导致免疫球蛋白的多样性。

B 淋巴细胞并不是在分化过程中发生基因组改变的唯一细胞类型，免疫系统的另一类重要细

胞——T 淋巴细胞在形成抗原受体的过程中也经历基因重排，丢失基因组的部分成分。在 B 系和 T 系细胞中介导 DNA 重排事件发生的重组酶(recombinase)非常相似，因为这两种蛋白质识别的信号区都在靠近 DNA 重排序列的上游，而且编码重组酶的基因都在即将发生基因重排的 pre－B 细胞或 pre－T 细胞中才被激活。重组酶基因在成熟 B 细胞、T 细胞和大多数其他细胞中都是无活性的。此外，在脑和神经细胞中也存在基因重排和重组酶，可能与特定靶位点结合的神经细胞轴突中有些受体分子的产生涉及几个基因区的重排。

4．免疫球蛋白基因的顺式调节

免疫球蛋白基因转录的顺式调节序列主要是启动子和增强子。这些特异性的序列位于重链和轻链基因的附近，并能与一些细胞核内的因子结合，参与免疫球蛋白基因的转录。

V(D)J 结合和类型转换的发现可以解释抗体多样性起源的大多数问题，但是也产生了一些新的问题。每个 V 基因片段都有自己临近的启动子，为什么不是每个 V 基因片段都表达呢？克隆基因的缺失图谱显示，免疫球蛋白轻链启动子含有几个转录相关的重要区域。有一种启动子上游元件称为 octa box，是由 ATTTGCAT 这 8 个碱基对组成的序列。这个 octa box 在所有免疫球蛋白轻链启动子中都存在。而免疫球蛋白重链启动子则含有一个倒位的 octa box：ATGCAAAT 序列。如果把 octa box 插入体外培养 B 淋巴细胞珠蛋白基因的上游，珠蛋白基因转录可增加 11～18 倍。但是这种现象只发生于淋巴细胞，在成纤维母细胞中并不发生。

免疫球蛋白轻链基因增强子位于 VJ 序列和 C 区之间的第一个内含子序列中。如果把这个增强子序列转移到克隆的珠蛋白基因上，珠蛋白基因也可以在淋巴细胞中发生特异性转录。要在淋巴细胞中发生转录，启动子与增强子必须靠近。尽管所有的 V 区基因片段都携带增强子，但是只有靠近恒定区的 V 基因片段被激活，而这种位置关系是在免疫球蛋白基因形成时才形成，基因重排的结果使一个特殊的启动子与增强子靠近。重链基因存在类似的情况，在类型转换中 VDJ 片段一直保留着增强子区。轻链的增强子位于 J 基因与 C 基因之间或 C 基因下游。

5．免疫球蛋白基因表达的反式调节

基因重排本身并不足以激活基因的活性，因为经过基因重排的免疫球蛋白基因，在成纤维细胞和肝细胞中并不具有转录活性。这是因为它的转录还需要淋巴细胞特异性反式调节因子。在 B 细胞系细胞(pre－B 细胞、B 细胞和浆细胞)的核中含有多种反式调节因子，这些因子都是由免疫球蛋白基因之外的其他基因编码，并能与顺式调节 DNA 序列结合，参与免疫球蛋白基因表达。例如与轻链启动子元件 octa box 相结合的特异性因子 Octa－2(NF－A2)，与轻链增强子特异性结合的 NF－κB 等。它能识别轻链增强子的 5′－GGGACTTTCC－ 3′序列，当 pre－B 细胞被诱导分化成为 B 细胞时，具有活性的 NF－κB 就出现在细胞核内。尽管 NF－κB 也存在于其他许多类型的细胞中，但与一个 M_r 为 65×10^3 蛋白——κ 抑制子 IκB 结合，NF－κB 不能进入细胞核与 DNA 结合，所以 NF－κB 仅发现于成熟 B 细胞和浆细胞的细胞核中成为特异性调节因子。免疫球蛋白轻链基因表达的起始，可能是在信号分子作用于细胞表面受体时，激活了蛋白激酶活性，使 IκB 磷酸化并释放与其结合的 NF－κB，后者可进入细胞核与识别的 DNA 位点结合。

除了在 B 淋巴细胞中存在免疫球蛋白基因转录的正调控之外，在其他细胞中也存在免疫球蛋白基因转录的负调控。在免疫球蛋白基因旁边有几个位点可以结合沉默子，称为沉默子区。在非 B 细胞中沉默子与该区结合以抑制基因转录。

六、转录因子活性的调节

（一）转录调节

如果转录因子是调节特定基因表达的蛋白质，那么这些转录因子本身又是如何被调节的呢？最简单的方法就是通过其他转录因子调节该转录因子的合成。

果蝇发育的基因控制就采用了此方法，这个方法涉及一连串转录因子的合成。例如 BICOID 蛋白激活 *hunchback* 基因，新合成的 HUNCHBACK 蛋白又激活 *Krüppel* 基因，KRÜPPEL 蛋白再激活 *odd - skipped* 基因，等等。在这种连锁反应中，人们一直可以追溯到合子细胞质中的母体效应因子，它们对于果蝇早期胚体前后体轴的形成是极为重要的。

哺乳动物有几种转录因子是受其他转录因子的合成调节的，如 MyoD 和 PIT－1 等。这些转录因子一般具有复杂的启动子和增强子，而且只能在特定细胞中表达。例如小鼠 *myogenin* 基因只能在肌节、咽弓和肢芽中表达。*Myogenin* 上游调节区至少有三个可以分开的位点。最近的位点为该基因在肢芽中的转录所必需，如果此位点发生突变，*myogenin* 基因在肢芽中就不转录；第二个位于上游稍远一点的位点是该基因在肌节、咽弓和躯干后部体节的中部细胞转录必需的；第三个位点位于上游更远一点的位置，为促进该基因的有效转录所必需。这三个位点结合不同的转录因子。又如 *myf－5* 基因也存在类似的情况，在 DNA 的不同区域有调节不同表达图式的元件。

（二）蛋白质的修饰和 RNA 剪接

转录因子另一种调节机制是通过磷酸化的途径。在有些情况下，转录因子蛋白质虽然存在但是无活性，通过磷酸化可以激活无活性的蛋白质。如前所述，无活性的转录因子当它的抑制物蛋白质如 IκB 被磷酸化后，可以使转录因子 NF－κB 释放并进入细胞核与其识别的 DNA 序列结合。磷酸化也可以直接发挥作用。当 α－干扰素与其细胞表面受体结合时就激活酪氨酸激酶，此激酶能使存在于细胞质中的三种 ISGF3－α 蛋白质发生磷酸化。一旦这三种蛋白质分子被磷酸化就相互结合形成一种转录因子进入细胞核，在核内与第四种蛋白质结合，使干扰素编码基因开始转录。另一方面，磷酸化也可以抑制转录因子的作用。例如 PIT－1、OCT－1 或 MYOGENIN 在磷酸化后与 DNA 的结合被抑制。

如前所述，同一基因不同外显子的剪接可以产生许多种蛋白质。一种细胞中的外显子可能在其他细胞中变成内含子。TFE3 是 bHLH－bZip 的转录因子，它能与免疫球蛋白重链基因的启动子和增强子结合。在大多数细胞中也产生 TFE3，但是不同于淋巴细胞的 TFE3，是 RNA 改变了剪接方式的翻译产物。在这种 RNA 剪接中，TFE3 活性片段中一个外显子被去掉。这种蛋白质能够形成活性二聚体，起抑制作用。转录因子常常可以在多个水平上对基因转录进行调节，在有些情况下，一个转录因子可通过几种方式来调节，对于一个基因常有多个转录因子进行调节。总之，基因指导蛋白质的合成，基因表达又受蛋白质的指导和调节。

参考文献

1 Beimesche S, *et al*. Tissue-specific transcriptional activity of a pancreatic islet cell-specific enhancer sequence/Pax6 binding site determined in normal adult tissues in vivo using transgenic mice. Mol. Endocrin.,1999,13: 718～728

2 Bestor T H, Ingram V M. Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: Purification sequence specificity and mode of interaction with DNA. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, 82: 2 674～2 678

3 Blom van Assendelft, *et al*. The β-globin dominant control region activates homologous and heterologous promoters in a tissue-specific manner. Cell, 1989, 56: 969～977

4 Boulet A M, Erwin C R, Rutter W J. Cell-specific enhancers in the rat exocrine pancreas. Proc. Natl. Acad. Sci., 1986, 83: 3 599～3 603

5 Chen J L, *et al*. Assembly of recombinant TF Ⅱ D reveals differential cofactor requirements for distinct transcriptional activators. Cell, 1995, 79: 93～105

6 Chong J A, *et al*. REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. Cell, 1995, 80: 949～957

7 Grosveld F, *et al*. Position-dependent high-level expression of the human β-globin gene in transgenic mice. Cell, 1987, 51: 975～985

8 Gruenbaum Y, Ceder H, Razin A. Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase. Nature, 1982, 295: 620～622

9 Gualdi R, *et al*. Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. Genes. Dev., 1996, 10: 1 670～1 682

10 Guyette W A, Matusik R J, Rosen J M. Prolactin-mediated transcriptional and posttranscriptional control of casein gene expression. Cell, 1979, 17: 1013～1023

11 Hanscombe O, *et al*. Importance of globin gene order for correct developmental expression. Genes Dev., 1991, 5: 1 387～1 395

12 Hemesath T J, *et al*. Microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. Genes Dev., 1994, 8: 2770～2780

13 Karlsson S, Nieuhaus A W. Developmental regulation of human globin genes. Annu. Rev. Biochem., 1985, 54: 1 071～1 108

14 Kioussis D, *et al*. Beta-globin gene inactivation by DNA translocation in gamma-beta thalassemia. Nature, 1983, 306: 662～666

15 Mavilio F, *et al*. Molecular mechanisms for human hemoglobin switching: Selective undermethylation and expression of globin genes in embryonic, fetal, and adult erythroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci., 1983, 80: 6 907～6 911

16 Sander M A, *et al*. Genetic analysis reveals that Pax6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. Genes. Dev., 1997, 1: 1 039～1 046

17 Sauer F, *et al*. Control of transcription by Krüppel through interactions with TF Ⅱ B and TF Ⅱ E. Nature, 1995, 375: 162～165

18 Schlissel M S, Brown D D. The transcriptional regulation of *Xenopus* 5S RNA genes in chromatin: The roles of active stable transcription complex and histone HI. Cell, 1984, 37: 903～913

19 Shatkin A J. Capping of eucaryotic mRNAs. Cell, 1976, 9: 645～653

20 Sopta M, Burton Z F, Greenblatt J. Structure and associated DNA helicase activity of a general transcription factor that binds to RNA polymerase Ⅱ. Nature, 1989, 341: 410～415

第十八章　RNA 加工水平的调控

细胞分化的本质在于不同类型的细胞产生一系列差异蛋白质。大多数编码细胞特异性蛋白质的基因选择性表达的调控主要发生在转录水平，但是转录后的调控对于决定某些蛋白质的结构与功能，以及决定细胞分化的多样性表型也具有十分重要的意义。许多基因含有大量的内含子序列，但是 RNA 前体的长度与其对应模板相同，所以大量的核苷酸序列在 RNA 加工中被删除。不同类型的细胞可采用不同的 RNA 加工方式，同一核转录产物可以被加工成不同的细胞质 mRNA。

第一节　mRNA 前体与 mRNA

一、异质性核 RNA

真核细胞最初的转录产物并不是细胞质中的 mRNA，而是细胞核 RNA（nuclear RNA，nRNA）。由于转录模板不同，细胞核内前体 RNA 的长度和性质差异较大，所以核 RNA 又称为异质性核 RNA（heterogeneous nuclear RNA，hnRNA）。hnRNA 相对分子质量比 mRNA 大，半衰期也较短。hnRNA 分子约含（5～19）×10^3个核苷酸，而 mRNA 通常只有 2×10^3个核苷酸；海胆胚胎 mRNA的半衰期约 5 h 而其 hnRNA 的半衰期仅 20 min。对于 hnRNA 与 mRNA 的关系直到 20 世纪 70 年代多个实验室同时发现 hnRNA 包含着 mRNA 序列后才开始了解。Bastos 和 Aviv（1977）提取小鼠珠蛋白 mRNA，用逆转录酶将其反转录成 cDNA，再将后者与纤维素小珠偶联制备纤维素酯柱。把产生血红蛋白的红细胞放在含放射性尿嘧啶核苷培养液中孵育一定时间后抽提标记 RNA 并过柱。此时所有编码珠蛋白的 RNA 都应该结合在柱上，再用低浓度的离子溶液将结合在柱上的 RNA 分子洗脱下来。当细胞标记 5 min 时大多数结合柱上的标记 RNA 沉降系数为 27 S，长约 5 000 个核苷酸。也就是说这些 RNA 序列的长度约为胞质内珠蛋白 mRNA 的 8 倍。如果停止标记 5 min 后才抽提 RNA，珠蛋白 RNA 的沉降系数较小为 15 S。最终得到编码珠蛋白的 RNA 沉降系数为 10 S，长约 600 核苷酸，与胞质内 mRNA 的特征相当。因此 hnRNA 似乎包含胞质珠蛋白 mRNA 前体。Hames 和 Perry（1977）用小鼠培养细胞的 mRNA，制备 cDNA 进行研究也获得了类似结果。说明动物基因组 DNA 转录较大的细胞核 RNA（nRNA）作为胞质 mRNA 前体。

二、细胞核 RNA 和 mRNA 的复杂性

核苷酸序列的多样性称为复杂性（complexity）。为了测定和比较细胞核和细胞质 RNA 的复杂性，将一定量放射性标记的 RNA 加入过量变性 DNA 再复性。如果 RNA 复杂性越大，与 DNA 复性速度就越慢。也就是说，如果只存在一种 RNA 时，RNA 分子均一分布于整个反应液中，能迅速寻找到互补 DNA；但如果加入放射性标记的 RNA 量相同而类型多，例如有 1 000 种时，每种 RNA

实际上被稀释了 1 000 倍，所以在同样的时间内与互补分子配对的几率减小。双链 DNA－RNA 杂交分子很容易从未杂交 RNA 中分离，而且杂交分子中标记的 RNA 的百分比也能计算出来。通常绘制 C_0t 曲线分析其复杂性，C_0 值标记核酸起始浓度(mol/L)，t 是时间(单位为 s)。复性程度依赖于浓度和时间，用复性 RNA 百分率和 C_0t 值作图。采用类似的方法对 DNA 进行分析，发现基因组的一些 DNA 序列重复出现数百万次(高度重复序列)，另有一些序列重复数千次(中度重复序列)，还有些 DNA 序列如编码酶的基因，在每个单倍体基因组中只有一个拷贝(图 18.1)。

利用这个方法可证明同种细胞 nRNA 的复杂性明显地大于 mRNA 的复杂性。海胆囊胚细胞 nRNA 与 DNA 复性非常迅速，表明转录成 nRNA 分子的 DNA 序列含有重复序列，而海胆囊胚细胞的 mRNA 并不与重复 DNA 序列杂交。如果剪切 nRNA 获得长约 1 100 个核苷酸片段，于低 C_0t 值时就有 25% 能与 DNA 结合。海胆 nRNA 重复序列平均长度约 300 bp，估计 70% 的 nRNA 分子至少含一个重复序列。若将 RNA 与不含重复序列的纯化 DNA 反应可消除重复序列的影响。nRNA的复杂度通常大于同种组织或细胞 mRNA 的 4～20 倍。根据研究结果估计海胆胚胎只有 10%～20%的 nRNA 转变为 mRNA(表 18.1)。大鼠肝脏细胞只有 11%的 nRNA 转变成 mRNA；培养细胞甚至低至 5%。

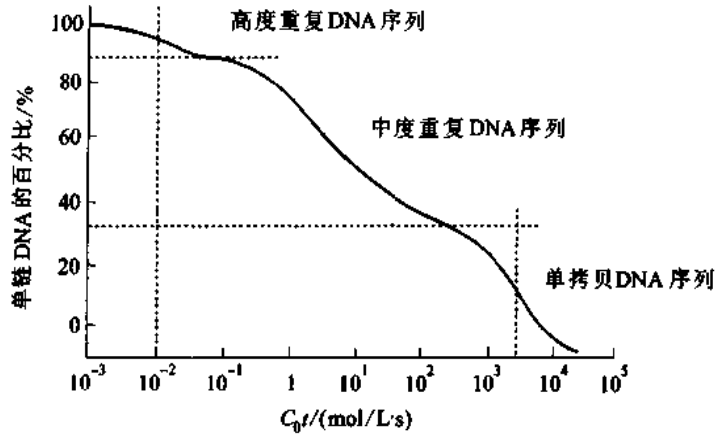


图 18.1 真核生物基因组 DNA 的 C_0t 曲线分析

利用 C_0t 曲线分析典型真核生物基因组 DNA，发现存在高度重复序列、中度重复序列和单拷贝序列

表 18.1 几种 mRNA 和 nRNA 的动力学参数和相对复杂性

RNA 的来源	nRNA 转变成为 poly(A)＋ RNA(包含 mRNA)	
	转变量的百分率/%	转变复杂性的百分率/%
果蝇(*Drosophila*)	14～20	28～40
蚊(*Aedes*)	3	13
海胆	4～7	17～29
培养的人癌细胞(Hela cell)	3～6	15～30

综上所述，在细胞核内的基因转录产物中含有一组 RNA，它们是细胞质 mRNA 的前体。但是 nRNA 中的大部分在核内迅速代谢和降解，所以只有部分 nRNA 能加工成 mRNA 分子。

三、前体 RNA 的加工对早期发育的调控

由基因组的转录产物经过加工成为 mRNA 的过程，表明分化的调控机制有可能通过转录后 mRNA 前体的不同加工方式来实现。对海胆及大鼠的研究证实了这种观点。

Kleene 及 Humphreys(1977)将海胆囊胚 DNA 变性，分离 C_0t 值高达 200 时也不产生复性的 DNA，从而获得海胆单拷贝 DNA(single－copy DNA)。用单拷贝 DNA 与各发育时期的nRNA进行杂交，发现囊胚细胞的 nRNA 能与 15%的单拷贝 DNA 结合；用大量长腕幼虫期细胞提取的 nRNA 也只能与 15%单拷贝 DNA 结合。采用单链 DNA 与 nRNA 杂交，15%单拷贝 DNA 相当于基因组 DNA 分子的 30%。即大约有占 30%的基因组 DNA 转录成囊胚 nRNA，同时也有约 30%基因组 DNA 激活转录生成长腕幼虫 nRNA。为了研究这两个不同发育时期进行转录的 DNA 是否相同，又将囊胚期和长腕幼虫期的 nRNA 混合再与变性单拷贝 DNA 分子反应。结果混合 nRNA 也只能与 15%单拷贝 DNA 杂交(图 18.2)。说明囊胚期 nRNA 和长腕幼虫期 nRNA 与单拷贝 DNA 杂交的序列相同，也就是说囊胚期与长腕幼虫期细胞 nRNA 是相同的。Kleene 和 Humphreys(1977，1985)将分离的单拷贝 DNA 进行放射性标记，与长腕幼虫期或囊胚期 nRNA 在高 C_0t 时进行杂交。通常在这种情况下只要有互补 RNA 序列存在，放射性标记的 DNA 就能与 RNA 杂交。再进一步分离不能与囊胚期 nRNA 杂交的囊胚期无效 DNA(blastula－null DNA)和不能与长腕幼虫期 nRNA 杂交的长腕幼虫无效 DNA (pluteus－null DNA)。用囊胚期无效 DNA 与囊胚期nRNA反应，或用长腕幼虫无效 DNA 与长腕幼虫期 nRNA 杂交都不能观察到高于背景水平的杂交斑。进一步说明囊胚期处于转录激活状态 DNA 序列与长腕幼虫期完全一致。

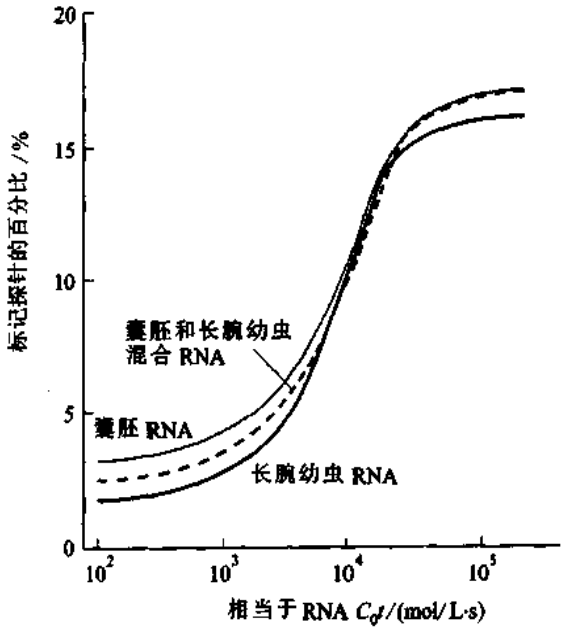


图 18.2 不同发育时期海胆 nRNA 与单拷贝 DNA 探针杂交的情况

用^{3}H 标记单拷贝 DNA 探针与囊胚期 nRNA、长腕幼虫期 nRNA 和囊胚期与长腕幼虫期的混合 nRNA 进行杂交，三种 nRNA 都能与 15%单拷贝 DNA 探针杂交。表明囊胚期 nRNA 与长腕幼虫期 nRNA 相同

发育的调控机制存在 RNA 加工水平的最初证据来自于对海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)的研究。Davidson 实验室发现海胆 mRNA 的复杂性(complexity)，即 mRNA 的种类随发育进程逐步减小(图 18.3)。卵母细胞 mRNA 与 4.5%基因组 DNA 杂交，从 C_0t 值推算其复杂性约达 37 000 kb。假定每个 mRNA 分子平均长 2 000 bp，则相当 18 500 种 mRNA。囊胚期 mRNA与 3.1%基因组 DNA 杂交，有相当于 13 000种 mRNA；原肠胚 mRNA 仅与 2.0%的基因组 DNA 杂交，有相当于 8 000 种 mRNA；在组织分化以后，各种组织约有 6 000 种 mRNA，只能与 0.75%基因组 DNA 杂交。可见随发育进程由基因组 DNA 转录所产生的细胞质 mRNA 的复杂性逐步减小。

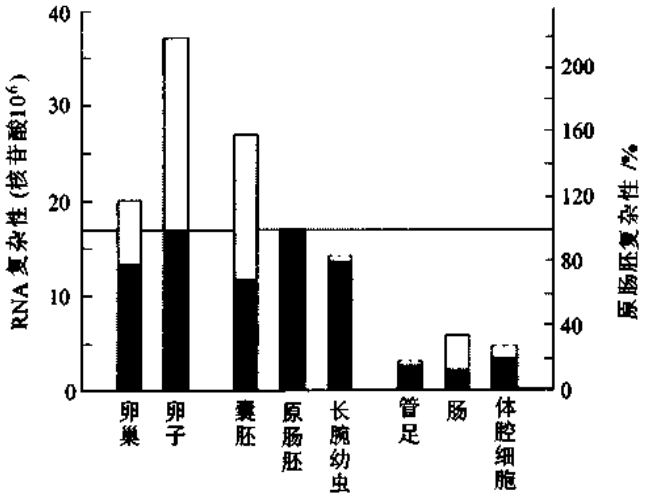


图 18.3 海胆不同发育时期和不同组织基因表达复杂性的比较

黑色带示与原肠胚相同的 mRNA,浅色带示与原肠胚不相同的 mRNA。以原肠胚 mRNA 的复杂性为 100%,随发育进程 mRNA 的复杂性逐步减小

mRNA 的复杂性随发育进程逐步减少并不是由于基因组 DNA 转录发生改变引起的。Wold 等(1978)提取海胆囊胚期 mRNA 与经过变性和放射性标记的 DNA 杂交,然后洗脱杂交体再变性并分离其中的 DNA,获得特异性识别囊胚期 mRNA 序列的 DNA 探针。这种 DNA 探针能够专一性识别囊胚期 mRNA 序列,约占 78% 的囊胚期 DNA 探针能与囊胚期 mRNA 结合,故称其为囊胚期 mDNA 探针。用囊胚期 mDNA 探针与各种成体已分化组织的总 RNA 都能杂交。约 80% 囊胚期 mDNA 与原肠胚细胞、成体肠细胞和体腔细胞 nRNA 杂交,但是只有 10% 囊胚期 mDNA 探针能识别肠细胞 mRNA 并与其杂交。表明囊胚期 mRNA 的前体在成体肠细胞、体腔细胞和原肠胚细胞核内都有转录,也同样存在于这些细胞的 nRNA 中,但是细胞质内与囊胚期相同的 mRNA 很少。已分化的体腔细胞和肠细胞的细胞核能进行囊胚期特异性基因转录的现象表明海胆绝大多数基因表达的调控发生在 RNA 加工水平。以后对大鼠和小鼠的研究进一步表明脑、肝和肾细胞的 nRNA 完全等同。这些研究结果说明基因表达在 RNA 加工水平的调控机制对于保证早期胚胎发育的正常进行也是非常重要的。

四、细胞核中未加工 mRNA 前体存在的证据

前述实验已说明各种已分化细胞 nRNA 的等同性,所以用针对某种细胞特异性 mRNA 的探针进行分子杂交时,标记探针有可能出现在不表达该产物的细胞核内。利用珠蛋白 mRNA 制备的 cDNA 探针可以检测到小鼠肝和脑组织、培养的小鼠细胞、未诱导的白血病细胞,甚至爪蟾卵母细胞的 nRNA 中都存在珠蛋白 mRNA 前体。用此方法在鸡的肝、脾、脑及心脏细胞中也检测到卵清蛋白基因的低水平转录,甚至有些特异性基因转录调控因子的 mRNA 也在不表达其产物的细胞核中检测到微量前体(表 18.2)。

某些类型的细胞能把 nRNA 剪接成特定 mRNA,但是其他种类的细胞并不具备此能力。小鼠

表 18.2　组织间结构基因 nRNA 和 mRNA 序列的比较

涉及的互补探针	与亲代 mRNA 的反应/%		与其他 mRNA 的反应/%		与 nRNA 的反应/%	
海胆囊胚期 mRNA(单拷贝 cDNA)	海胆囊胚期	100	肠	12	肠	97
			体腔细胞	13	体腔细胞	101
小鼠脑组织 mRNA(总 cDNA)	小鼠脑组织	100	肾	78	肾	102
小鼠脑组织特殊 mRNA(cDNA)	小鼠脑组织	100	肾	56	肾	100

多瘤病毒和猴病毒 SV40 感染细胞后，病毒通过整合进宿主细胞基因组 DNA 转录病毒 RNA，进而翻译成病毒特殊的蛋白质。多瘤病毒和 SV40 的转录产物与其所寄生宿主细胞的核转录产物相似，必须经过剪接，删除内含子。只有经 RNA 加工后才能产生在细胞质中稳定积累的病毒 mRNA。其他有些病毒在细胞内复制其转录产物不需要通过剪接也可以稳定地积累。未分化的畸胎瘤干细胞不能被 SV40 和多瘤病毒感染，在未分化的畸胎瘤干细胞中也未检测到病毒基因的表达。但是如果这些干细胞分化成为体细胞后就突然变得对这两种病毒的感染非常敏感。分析未分化的畸胎瘤干细胞不被病毒感染的原因，主要是因为它们无法完成病毒 RNA 的加工过程，无法剪接多瘤病毒和 SV40 mRNA 前体。相对分子质量较大的病毒 mRNA 前体只能在干细胞核内积累以至最后降解。只有已分化的细胞能够进行病毒 nRNA 的加工，产生胞质病毒 mRNA。而某些不需要 RNA 加工的病毒在畸胎瘤干细胞和已分化的细胞中都能生长。SV40 RNA 的剪接反应只发生在已分化的小鼠细胞以及畸胎瘤衍生细胞中说明细胞分化可能依赖于剪接酶的自身表达。催化和调节 SV40 RNA 加工反应的剪接酶无疑对这些细胞的分化很重要，其中几种 mRNA 前体的加工是细胞分化所必需的。

第二节　RNA 加工水平的调控

一、淋巴细胞的差别 RNA 加工使同一基因合成不同的蛋白质

对于几种特殊蛋白质的形成，RNA 加工水平的调控是非常重要的。目前了解得最清楚的是 B 淋巴细胞分化中不同抗体(免疫球蛋白)的合成。在淋巴细胞发育过程中，编码抗体基因的表达以及抗体对抗原的应答反应，都涉及大量的选择事件和基因片段的重排。这些事件的大多数发生在 DNA 水平，但是在 RNA 加工水平也存在一些重要的调控机制。

B 淋巴细胞在尚未分化成抗体分泌细胞之前的发育阶段，已能合成特殊的抗体分子。这种抗体分子既能在以后的发育阶段中作为分泌性抗体分泌到细胞外，也能以膜结合蛋白的形式插入淋巴细胞质膜，在后一种情况下其功能相当于细胞表面抗原受体。根据细胞所处的发育时期，以及是否已经经历抗原刺激，细胞表面免疫球蛋白为 IgM 型或为 IgD 型。在抗原刺激之前 B 淋巴细胞的表面免疫球蛋白均为 IgM 型；一旦受到抗原刺激 IgM 和 IgD 两种免疫球蛋白同时产生；以后，细胞表面只存在 IgD 型。但在某一特定淋巴细胞及其后代的整个分化过程，免疫球蛋白的可变区(抗原结合区域)始终保持一致。IgM 和 IgD 的分子转换发生在 RNA 加工水平。免疫球蛋白基因转录一种 nRNA 分子，包括编码可变区(抗原结合部位)以及 μ(IgM)、δ(IgD)恒定区域的外显子，各外

显子之间由内含子隔开。编码 IgM 或 IgD 的 mRNA 能否产生和进入细胞质依赖于剪接机制的选择。如果在 RNA 加工中，δ 外显子被剪接删除产生 IgM mRNA；如果是 μ 外显子被剪接删除则形成 IgD mRNA。在抗原刺激后的早期分化阶段，由于两种剪接机制都可以同时被采用，所以 IgM 和 IgD 这两类免疫球蛋白都能合成(图 18.4)。

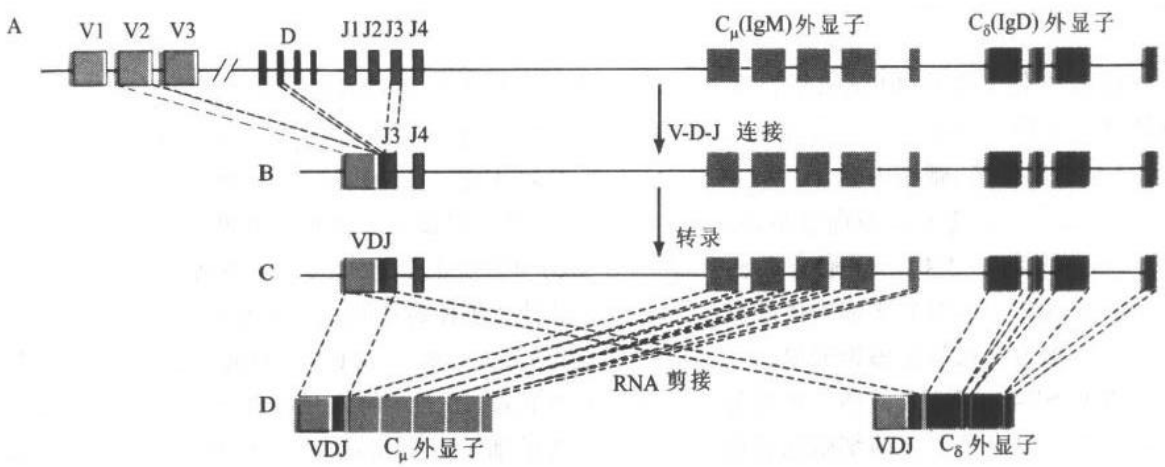


图 18.4 B 淋巴细胞 IgM 和 IgD 表达模式图

A 示生殖细胞的 DNA 结构，B 示 B 淋巴细胞的 DNA 结构，C 示 mRNA 结构，D 示 mRNA 的结构。重链基因在淋巴细胞发育过程中形成，是通过 V、D 和 J 片段的重排并与恒定区 μ 或 δ 外显子结合形成。基因转录包括重排的可变区和恒定区 μ 或 δ 外显子。通过 RNA 选择性加工，可删除恒定区 μ 外显子或者恒定区 δ 外显子

除了在 IgM 或 IgD 的选择合成中依赖于不同的 RNA 加工方式之外，免疫球蛋白存在的形式即以膜结合蛋白形式还是分泌性蛋白形式存在，也决定于 RNA 的加工方式。IgD 通常只分布在细胞膜上，血清 IgD 可能只是由于偶尔渗漏或细胞死亡所导致。但是 IgM 既能以膜结合型(mIgM)存在于细胞表面，同时也能以分泌型(sIgM)存在。结合于膜上的 IgM 作为抗原受体，分型泌 IgM 是有机体初次受抗原刺激后血液中最早出现的抗体类型。sIgM 与 mIgM 之间的差异仅在于羧基端，mIgM 含疏水性的“尾”部，因此能插入质膜内。mIgM 和 sIgM 的 mRNA 也是不相同的，虽然两者都由相同的 Cμ 基因转录而来，但是加工方式存在差异。sIgM 的 mRNA 含 VDJ 基因编码区和 Cμ1、Cμ2、Cμ3、Cμ4 外显子序列。mIgM mRNA 也含有同样的序列但是末端被取代，增加另外两个外显子 Cμ5 和 Cμ6 编码区，由它们形成免疫球蛋白疏水性尾部，可使蛋白整合于淋巴细胞质膜上。由于 RNA 剪接方式选择的差异，决定有些免疫球蛋白分子是 sIgM 而另一些是 mIgM。

抗体形成过程还有第三个步骤，在该步骤中不同 RNA 加工也起着重要作用。已知每个 B 淋巴细胞只合成一种类型的抗体分子，其产生的调控机制在于，两个同源染色体中只有一个染色体 DNA 上的基因转录获得具有活性的抗体分子，这种现象称为等位排斥(allelic exclusion)。事实上另一染色体 DNA 上的抗体基因也同样进行转录，但是所转录的产物是不经历重排或不能正确重排的抗体 nRNA，所以这些基因转录产物不能加工成另一类型的 mRNA，也就没有另一种类型的抗体合成。

二、相同基因在不同发育时期或不同组织细胞中合成不同的蛋白质

大量的证据说明，RNA加工水平的调控，对于免疫球蛋白基因的表达具有十分重要的意义，此外，对于其他几十种已知基因的表达也是非常重要的。相同基因由于经历不同方式RNA加工，可调控基因表达生成不同蛋白质产物。有些例子是因为RNA剪接方式不同导致不同蛋白质的产生。如某些甲状腺细胞的特异性mRNA前体经过剪接加工生成降钙素mRNA；然而，同样的mRNA前体在神经细胞中却剪接加工成一种神经肽CGRP mRNA(图18.5)。神经细胞可能具有神经元专一性剪接调控因子，该因子作用于多种可选择性剪接的mRNA前体，从而保证一系列神经细胞专一性蛋白质的产生。又如人类有五种纤连蛋白(fibronectin)，其中有的纤连蛋白具有器官和组织专一性。它们是同一纤连蛋白基因表达的不同产物。由于纤连蛋白前体mRNA经历不同的RNA剪接加工，形成含有不同外显子序列的mRNA，结果翻译产生不同的纤连蛋白。在胚胎细胞迁移过程中某些类型纤连蛋白表达，而另一些则未表达。这表明纤连蛋白基因产物的选择性剪接对于完成胚胎细胞的不同功能非常重要。选择性剪接mRNA前体是不同组织产生不同类型神经细胞黏着分子(neural cell adhesion molecule，NCAM)的重要机制。另外与生长激素结合的血清可溶性蛋白和膜结合生长激素受体也是由同一基因编码，由于核内的转录产物被选择性剪接，结果产生两种蛋白质。因此RNA的选择性剪接加工能使一个基因产生一个蛋白质家族。

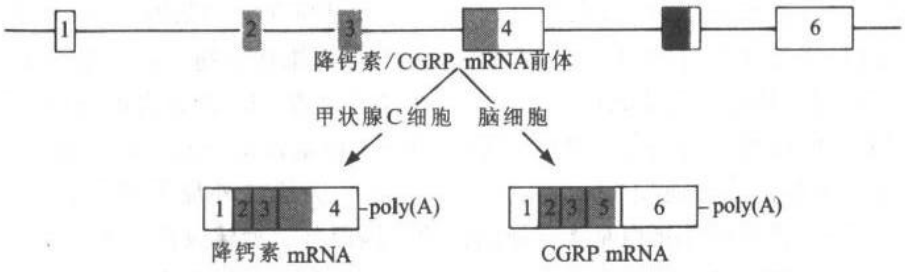


图18.5 降钙素/CGRP mRNA前体选择性剪接示意图

该基因在甲状腺C细胞中利用外显子1、2、3和4产生降钙素mRNA；而在脑细胞中利用外显子1、2、3、5和6产生一种神经肽CGRP mRNA

不同类型的细胞利用同一种mRNA前体，以不同的方式进行RNA加工，还必须依赖于不同的细胞内剪接因子。例如肌肉特异性肌钙蛋白T，能把钙离子敏感性转移给肌动－肌球蛋白复合体，肌钙蛋白T的mRNA是在肌肉细胞核内通过剪接加工，使一定的外显子序列拼接在一起形成的。肌钙蛋白T的前体RNA能否选择正确的加工方式取决于肌肉专一性剪接因子。非肌细胞和单核成肌细胞由于缺乏肌肉专一性剪接因子不能进行外显子序列的正常拼接，只有多核肌管细胞具有肌肉专一性剪接因子能够对肌钙蛋白T的RNA前体进行正确加工。

三、选择性RNA加工与性别决定

分化细胞由于选择不同的RNA加工方式可产生不同特异性蛋白质。在决定细胞分化命运的早期事件中，选择性RNA的剪接加工也发挥着重要作用。对于果蝇性别表型的决定事件而言，由RNA的不同加工方式引起的差异基因表达是极其重要的调控机制。

果蝇性别表型的发育是由一系列基因控制的。由于这些基因的作用，使雄性细胞或雌性细胞X染色体与常染色体的比例适当。当X染色体与常染色体的比值为1时，即每个二倍体细胞中含两个X染色体时胚胎发育成雌性果蝇；当X染色体与常染色体的比值为0.5时，也就是每个二倍体细胞中含一个X染色体时胚胎发育成雄性。细胞中X染色体与常染色体的比例是受性别致死因子 *sex－lethal* 基因的调控。当 *sex－lethal*（*sex－1*）基因有活性时激活变异体 *transformer*（*tfm*）基因，后者将其转录产物加工成为有功能的雌性特异性 mRNA，在雌性特异性 *tfm* mRNA 存在的情况下，两性 *doublesex*（*dsx*）基因转录产物也被加工成为雌性特异性形式的 mRNA，导致雌性表型的产生。当 *sex－lethal* 基因无活性时，*tfm* 基因转录产物不能加工成有功能的雌性特异性 mRNA，*dsx* 基因转录产物被加工成为雄性特异性形式 mRNA，导致雄性表型的产生（图 18.6）。

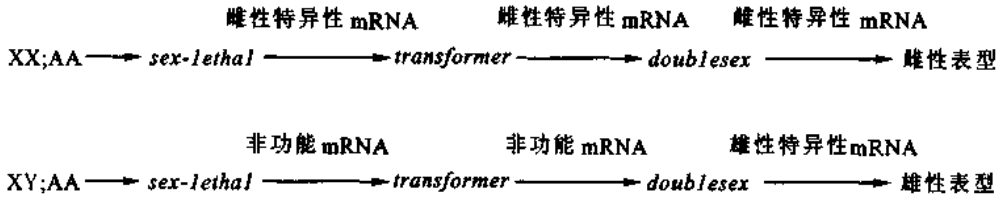


图 18.6 果蝇性别决定示意图

对于果蝇发育过程中的性别决定的控制，*tfm* 是一个非常关键的基因。*tfm* 基因的正常表达，对于雌性果蝇的形成是必需的，如果 *tfm* 基因缺失只能形成雄性果蝇。*tfm* 基因在整个幼虫阶段呈激活状态，其转录产物加工成为雌性和雄性都存在的普通型 mRNA 或者雌性特异型 mRNA。只有雌性果蝇具备选择性剪接的 *tfm* mRNA，这种 mRNA 也是该基因唯一的功能型 mRNA。在雄性及雌性果蝇中都存在的普通型 *tfm* mRNA 序列中，因为第二外显子就含有一个终止密码子 UGA，由这种 mRNA 产生的小蛋白是无功能活性的。因而普通型转录产物不具备性别决定功能。在雌性特异型 *tfm* mRNA 序列中，位于第二外显子中的这个终止密码子 UGA，作为内含子的一部分在 RNA 加工过程被剪接删除，故不影响 mRNA 的正常翻译。所以，*tfm* 的雌性特异型表达产物是该基因唯一有功能的产物。如果将雌性特异型转录产物的 cDNA 整合到 XY 果蝇基因组中也能使雄性果蝇转变成为雌性果蝇。雌性特异型 mRNA 编码的 TRANSFORMER 蛋白是一种富集精氨酸的多肽，长约 196 个氨基酸。

研究 XX 细胞中 *tfm* 基因采用选择性 RNA 加工方式，形成雌性特异型 mRNA 的原因，发现该基因特异型 RNA 选择性剪接涉及内含子中两个 3′末端剪接位点的竞争。这种竞争因 *sex－1* 基因活化状态而异。*sex－1* 基因是在性别决定的发育过程中最早起作用的基因之一，它的作用时间在 *tfm* 基因之前。在 XX 型胚胎中第一个被激活表达的基因是 *sex－1*，但是该基因在 XY 胚胎或幼虫中不具备活性。在 *sex－1* 基因有活性时可激活 *tfm* 基因，产生普通型和雌性特异型两种 mRNA，使果蝇发育成雌性；若 *sex－1* 基因缺乏或发生突变，*tfm* 基因只产生非功能性普通型mRNA，结果果蝇发育成为雄性。*sex－1* 基因产物对于调控 3′末端剪接位点的选择有一定意义，此调控有两种主要的途径：一种途径是封闭普通型受体位点使其产生变异，而选择利用雌性特异型剪接位点；另一种途径是激活雌性特异型剪接位点。应用体外突变技术构建新的 *tfm* 基因，使其普通型 3′末端剪接位点突变不再具备功能，再将这种基因插入 XY 胚胎基因组 P－因子，胚胎产生雌性特

异型 *tfm* 转录产物，发育成为雌性果蝇。*sex－1* 基因编码的蛋白质能直接结合到 *tfm* mRNA前体的特异型剪接位点或该位点附近，这种结合足以导致雌性特异型 mRNA 产生。因此，当普通型 *tfm* mRNA 剪接位点被封闭、突变或与 *sex－1* 基因产物结合则另一雌性特异型剪接位点被采用，最终发育成雌性果蝇。

tfm 基因在果蝇性别决定中的作用是调节另一个重要基因 *dsx* 的表达。*dsx* 基因对两性表型的形成都是必需的。*dsx* 基因突变可导致性别转换，使 XY 胚胎发育为雌性果蝇或使 XX 胚胎发育为雄性个体。在化蛹期间 *dsx* 基因的转录产物也有两种 RNA 加工方式，即产生雌性特异型 mRNA或雄性特异型 mRNA。雌性和雄性果蝇特异型 mRNA 序列中有三个外显子是相同的，但第四个外显子有差异。雄性特异型 mRNA 是删除了 RNA 前体较长一部分序列，而雌性特异型 mRNA 却含有这部分序列。

有人推测在 *dsx* 基因上游作用的性别基因如 *tfm* 的产物承担剪接因子作用，促使 *dsx* mRNA 前体加工成雌性特异型 mRNA。也就是说 *tfm* 基因产物可能类似于 *sex－1* 基因产物是一种剪接调控因子。如果 *tfm* 基因失活、突变或未活化(类似 XY 果蝇)，*dsx* 转录产物按照雄性特异型方式加工产生雄性果蝇。

四、RNA 3′末端的决定

1. 顺式作用元件

绝大多数真核生物 mRNA 的 3′末端通过两个连续的化学反应而形成，先切断 RNA 前体特定位点保留 3′末端羟基基团，然后在 3′末端多聚腺苷酸化，即增加约 200 个腺苷酸分子的 poly(A)尾。这种 3′末端的断裂和多聚腺苷酸化发生于 RNA 剪接加工之前，即剪接反应发生在多聚腺苷酸化的 mRNA 前体上。3′端加工反应可能由顺式作用元件和反式作用因子调控。第一种顺式作用元件是 AAUAAA 序列。最初产生的 RNA 中所含的 3′末端序列远远超过翻译终止位点。位于其末端序列中的 AAUAAA 序列对其下游 10～30 碱基位点发生的裂解是必需的。该序列如果突变则阻止 mRNA 3′末端的形成。另一顺式作用元件是 GU 或 U 富集序列，定位于 3′末端 AAUAAA 区域下游。该序列对 mRNA 3′末端裂解的效率非常重要。

2. 反式作用因子

顺式作用因子能被反式作用蛋白因子结合，由反式作用蛋白因子执行裂解 mRNA 前体及 3′末端多聚腺苷酸化的任务。从人类癌细胞的细胞核分离的五种核蛋白因子，为 mRNA 前体裂解和多聚腺苷酸化所必需的。第一种因子的相对分子质量为 290×10^3，是调节此过程的特异性核蛋白因子，能够识别发生裂解和进行多聚腺苷酸化的顺式因子。第二种核蛋白是 poly(A)聚合酶，其功能是合成多聚腺苷酸尾。另外两种蛋白，裂解因子Ⅰ和裂解因子Ⅱ是 mRNA 前体的裂解酶，但既不能合成 poly(A)尾也不能专一性结合 AAUAAA 信号序列。这四种因子组合在一起能在体外裂解 RNA 前体以及进行多聚腺苷酸化(图 18.7)。第五种核蛋白是裂解刺激因子，能显著提高裂解反应的效率。关于 RNA 前体裂解和加 poly(A)尾的机制仍然有待进一步阐明。在某些情况下存在选择性 poly(A)加尾位点，但是并不了解这些位点的选择是如何调控的。在另一些情况下使转录提前终止，其转录产物不能加 poly(A)尾。这种缺陷将导致截短的 mRNA 迅速降解。至少有两种蛋白利用此方式调节细胞增殖。在非增殖性细胞中这些基因进行转录但是转录并不能完成，只有在增殖性的细胞中可以完成 RNA 的正常转录。如使某基因的转录提前终止于接近第一外显子的

3′末端，即正常情况下非成熟性转录终止发生的位点，可以使本来应该进行非成熟性的转录不终止而完成全长序列转录，合成促有丝分裂蛋白，使正常细胞转变成恶性肿瘤细胞。也有的 mRNA 前体 3′末端加工并不包括多聚腺苷酸化，最典型的例子是组蛋白基因的转录产物既不含内含子也不具备 poly(A) 尾。

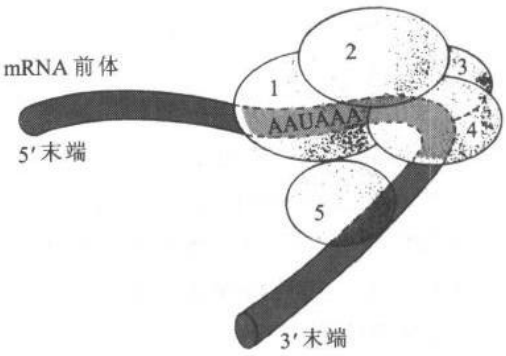


图 18.7 mRNA 3′末端形成和多聚腺苷酸化模型

mRNA 前体上的顺式作用元件 AAUAAA 序列被特异性核蛋白因子(1)识别，2～5 分别代表裂解刺激因子、裂解因子Ⅱ、裂解因子Ⅰ和 poly(A)聚合酶。由四种核蛋白因子组成的复合体共同进行 mRNA 前体的裂解反应

五、mRNA 向核外的运输

RNA 加工中最为神秘的过程是 mRNA 由核内运输到核外。很早人们就推测 mRNA 通过核膜孔运输，以后用胶体金标记的 RNA 或蛋白分子示踪，观察到 RNA 由核膜孔向胞质转运和细胞质内的蛋白质通过核膜孔进入细胞核。同时抗核孔蛋白的单克隆抗体能够阻止 RNA 运输，这种单克隆抗体并不影响转录活动，另一方面，RNA 加工也不会封闭核膜孔。

事实上，核内 RNA 运输到核外进入细胞质的过程效率非常高，不能靠简单的分子扩散来完成。有一种模式是 RNA 在核基质内完成转录和加工，然后将 mRNA 运输到核膜孔。如果按照此模式核基质中应该含有加工中的 mRNA。人们确实也发现兔红系(erythroid lineage)细胞核基质中存在未经剪接和部分剪接的 β－珠蛋白 mRNA 前体，以及鸡输卵管细胞核基质中部分剪接的卵清蛋白 mRNA 前体。对于病毒 mRNA 的研究也显示 mRNA 前体能够主动运输至核膜。腺病毒 mRNA 在核基质中转录，进入细胞质前被运输至核膜。有一种特殊的病毒蛋白是运输所必需的，如果编码该蛋白的基因发生突变，病毒 mRNA 只能聚集于核内，无法运输到核膜孔处。如果这种模式正确的话，某些 mRNA 能够从核孔转运出来而其余的 mRNA 不能从核孔转运出来，通过这种选择方式也可调控基因表达。对于肌肉专一性乙酰胆碱受体蛋白基因表达的研究发现，编码该蛋白的 mRNA 前体特异性定位分布于肌肉细胞细胞核的周围。但是 α－肌动蛋白也是一种肌肉特异性蛋白，α－肌动蛋白 mRNA 前体并不结合在核膜上。因此，细胞核以不同方式处理 mRNA 前体是存在于细胞分化中基因选择性表达调控的另一种方式。

mRNA 进入细胞质的机制并不十分清楚。核膜的胞质面常密布核糖体，核糖体对于 mRNA 运输出核膜孔可能也有关系。虽然目前我们还不能阐明其机制，但是已有一些实验证据。某种患 β－地中海贫血病人，第 39 个密码子突变导致翻译终止。但是克隆该患者的 β－球蛋白基因，在体外合成的 mRNA 与野生型 β－球蛋白 mRNA 具备同样的稳定性。Qrkin 和 Kazazin(1984)认为翻译必须在核膜的朝向胞质的一面进行，促使 mRNA 运输至核外。在翻译终止之后，mRNA 则无法完成向核外的运输过程。关于 RNA 剪接加工反应发生的具体时间，选择特定的 mRNA 前体并加工成组织专一性 mRNA 的核内机制，目前尚不能阐明。

参考文献

1 Alt F W, *et al*. Synthesis of secreted and membrane-bound immunoglobulin μ heavy chains is directed by mRNAs that differ at their 3′ ends. Cell, 1980, 20: 293～301

2 Amara S G, *et al*. Alternative Rna processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. Nature, 1982, 298: 240～244

3 Baker B, Nagoshi R N, Burtin K C. Molecular genetic aspects of sex determination in *Drosophila*. Bio Essays, 1987, 6: 66～70

4 Bastos R N, Aviv H. Globin Rna precursor molecules: Biosynthesis and processing eryroid cells. Cell, 1977, 11: 641～650

5 Baumbach W R, Horner D L, Logan J S. The growth hormone-binding protein in rat serum is an alternatively spliced from of the rat growth hormone receptor. Genes. Dev., 1989, 3: 1 199～1 205

6 Boggs R T, *et al*. Regulation of sexual differentiation in *D. melanogaster*, via alternative splicing of RNA from the *transformer* gene. Cell, 1987, 50: 739～747

7 Cline T. A female-specific lethal lesion in an X－linked positive regulator of the *Drosophila* sex determination gene, *Sex-lethal*. Genetics, 1986, 113: 641～643

8 Decker C J, Parker R. Mechanisms of mRNA degradation in eukaryotes. Trends Biochem., 1995, 19: 336～340

9 Edgar B F, *et al*. MPF regulation during the embryonic cell cycles of *Drosophila*. Genes Dev., 1994, 8: 440～453

10 Ferrandon D L, *et al*. Staufen protein associates with the 3′ UTR of bicoid to form particles that move in a microtubule-dependent manner. Cell, 1994, 9: 1 221～1 232

11 Gagnon M L, Angerer L M, Angerer R C. Posttranscriptional regulation of ectoderm-specific gene expression in early sea urchin embryos. Development, 1992, 114: 457～467

12 Guyette W A, Matusik R J, Rosen J M. Prolactin-mediated transcriptional and post-transcriptional control of casein gene expression. Cell, 1979, 17: 1 013～1 023

13 Lieberfarb M E, *et al*. Mutations that perturb poly (A)－dependent maternal mRNA activation block the initiation of development. Development, 1996, 22: 579～588

14 Sallés F J, *et al*. Coordinate initiation of *Drosophila* development by regulated polyadenylation of maternal messenger RNAs. Science, 1994, 266: 1 996～1 999

15 Wickens M, Stephenson P. Role of the conserved AAUAAA sequence: Four AAUAAA point mutants prevent 3′end formation. Science, 1984, 226: 1 045～1 051

第十九章　翻译和翻译后的调控

mRNA 被转录、处理和运送出核后，还需要经过翻译才能形成由基因所编码的蛋白质。翻译过程是很复杂的，因此在翻译水平有很多调控的可能性。发育中基因表达在翻译水平和翻译后的调控可概括为两个主要的方面：首先，细胞中已转录的 mRNA 是根据特定的细胞状况来决定能否被翻译，当细胞需要蛋白质合成量骤然增加时，例如当受精卵启动发育的程序时，就要利用翻译水平的调控机制，使大量蛋白质迅速合成；其次，翻译调控也被用作一个微调机制以保证从已有的 mRNA 形成非常精确的和一定量的蛋白质，基因在翻译水平的调控有多种方式，不同的细胞采用的方式不同。这种机制在有些蛋白质合成过程中起着重要作用，如血红蛋白的合成。

第一节　翻译水平的调控

一、翻译过程

翻译是以 mRNA 的核酸序列所包含的信息来指导特定多肽合成的过程。这一过程分为三个阶段：起始、延伸和终止（图 19.1）。它们分别被称为起始因子、延长因子和终止因子的可溶性蛋白质所调控。

（一）起始

通过起始过程形成起始复合物，这包含一个氨基酰（Met）－tRNA 和 mRNA 结合到核糖体上的反应。唯一能够起始翻译过程的 tRNA 是一种特殊的起始 tRNA 即 tRNAi，它携带的氨基酸是甲硫氨酸。首先是由于活化形式的起始因子 eIF2－GTP 的催化作用，将起始 Met－tRNAi 结合到 40S 小亚基上，此结合体才能与 mRNA 5′端的帽子形成复合体。mRNA 也需要先与帽子结合蛋白 eIF4F 以及其他 eIF 亚基结合，如果没有帽子 mRNA 结合到核糖体亚基上，反应常不能完成，所以 eIF4F 对翻译过程得以进行起着关键作用。细胞中 eIF4F 的数量比 mRNA 少，故一般认为 mRNA 必须竞争帽子结合蛋白，然后，起始因子 4A 与 eIF4F 结合，并与 mRNA 引导序列中的双螺旋发夹结合，eIF4B 和 ATP 激活 eIF4F 解开双螺旋；当双螺旋发夹处被其他稳定的二级结构掩盖时复合体就沿 mRNA 向下游移动，直到遇到一个合适的 AUG 密码子。并不是所有的 AUG 都可以用作起始密码子。在引起 40S 亚基停止移动并起始翻译的过程中，AUG 附近的核苷酸序列也是十分重要的。通过克隆突变基因和分析相应 RNA 的翻译反应，证明序列 ACCAUGG 是最重要的。其核苷酸的突变可以使翻译水平下降 20 倍。如 α－地中海贫血症的患者是由于正常的序列 ACCAUGG 突变成了 CCCAUGG 引起血红蛋白中 α 亚基缺陷。40S 亚基与 mRNA 上 AUG 的结合使起始 tRNA 恰好位于 AUG 密码子上。只有当 mRNA 被合适地置于 40S 小亚基上后，60S 核糖体大亚基才能结合进来，完成起始反应（图 19.2）。在这一过程中，与 eIF2 结合的 GTP 被水解为

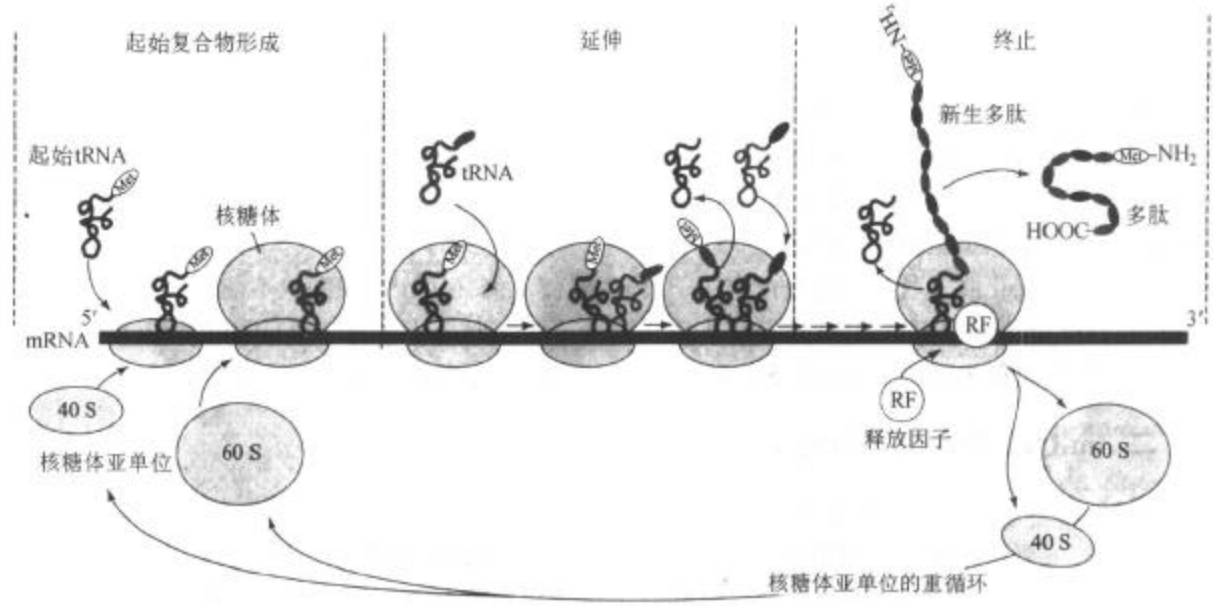


图 19.1　翻译过程示意图

翻译过程包括起始、延伸和终止三个阶段

GDP，为了结合一个新的起始 tRNA，eIF2 必须由 eIF2B 催化再形成 eIF2－GTP。

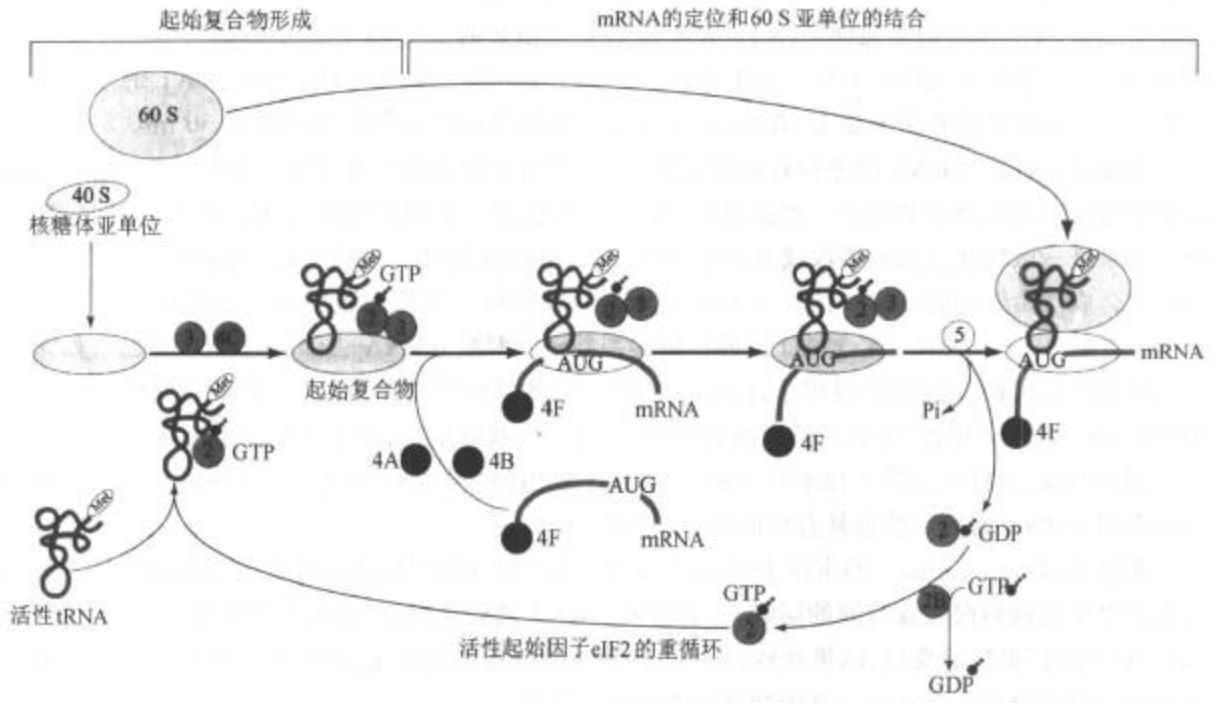


图 19.2　翻译起始反应示意图

图中 2B、2、3、4A、4B、4C、4F 分别为起始因子 eIF2B、eIF2、eIF3、eIF4A、eIF4B、eIF4C 和 eIF4F

(二) 延伸和终止

延伸是一个连续的过程,包括氨基酰-tRNA 依次与核糖体结合,氨基酸离开其运载体 tRNA,氨基酸之间形成肽键和氨基酸缩合,核糖体沿 mRNA 向下游移动,暴露出新的密码子供 tRNA 结合,使得另一个核糖体可以在 mRNA 的 5′端起始,并开始沿 mRNA 进行翻译一连串过程。由于每个 mRNA 上经常同时结合着几个核糖体,这种结构被称为多聚核糖体(polyribosome)或多聚体(polysome)。当核糖体遇到 mRNA 上的三种密码子 UAG、UAA 或 UGA 之一时,发生蛋白质合成的终止。这些核苷酸三联体叫做终止密码子,因为它们不能被 tRNA 识别故不能编码任何氨基酸。然而,它们却能被释放因子识别,后者将多肽从最后一个 tRNA 上水解下来并使之与核糖体脱离。随着核糖体分离成为两个亚基,翻译过程又可重新开始,如此周而复始地进行下去。

二、mRNA 寿命的不同对蛋白质合成的调控

通过 mRNA 的选择性降解和 mRNA 稳定性不同调控蛋白质的合成,这是在翻译水平上调控基因表达的主要机制之一。如果 mRNA 在进入细胞质后很快就被降解,只能合成很少的蛋白质。如果一个 mRNA 尽管寿命相对较短,但能够被选择性地稳定存在于某一特定时期的特定细胞中,那么就能在特定的时间和空间合成大量特异性蛋白质。mRNA 选择性降解的调控机制与 mRNA 的寿命相关,而后者由其 3′末端非翻译区的序列决定。

在一个细胞中,不同 mRNA 有不同的寿命。稳定的 mRNA 半寿期比较长,如 β-珠蛋白的 mRNA 的半寿期大约为 17 h,而一种生长因子 mRNA 的半寿期不超过 30 min。所以一个珠蛋白 mRNA 合成的蛋白质远远多于一个生长因子 mRNA 合成的蛋白质。调控 mRNA 半寿期的主要序列位于 mRNA 3′末端的非翻译区(3′UTR),一般半寿期短的 mRNA 在这个区域含有一个或多个富含 AU 区。若将生长因子 GM-CST 基因 3′末端 UTR 的一段,即 51bp 的富含 AT 的序列插入到兔 β-珠蛋白基因的 3′末端 UTR 中,形成的 β-珠蛋白 mRNA 的半寿期少于 30 min。

细胞对于各种 mRNA 能进行有差别地降解,这对细胞的功能十分重要。例如,c-*fos* 基因编码正常成纤维细胞分裂必需的一种蛋白质,其 mRNA 也有一个很长的富含 AU 的 3′末端 UTR 序列。如果这一区域通过实验手段或自然突变被删除,mRNA 的半寿期将变长,结果更多的 C-FOS 蛋白被合成。由于细胞在这一信号下不断地分裂形成肿瘤。肿瘤细胞都具有这种缺少 3′末端富含 AU 区的 c-*fos* 基因。富含 AU 区的作用是在翻译时刺激 mRNA 去除 poly(A)"尾巴",如果这个区域被删除或被其他的序列代替,poly(A)"尾巴"就保留下来使 mRNA 的半寿期延长。富含 AU 区与 poly(A)"尾巴"可能进行广泛的配对,形成一个双链结构,后者可被位于核糖体上的 RNA 酶识别和剪除,这样就去除了原来对 mRNA 起稳定作用的 poly(A)"尾巴"。某些位于卵母细胞和胚胎中的 mRNA 的稳定性也具有相似的控制机制。

在粘菌(*Dictyostelium*)的生活史中 mRNA 的 poly(A)"尾巴"的差别起着决定性的作用。在粘菌由营养生长期转向发育时期的同时,一套新的 mRNA 被转录,同时已有的营养生长期 mRNA 的 poly(A)"尾巴"很快地变短,结果新转录的 mRNA 被翻译而原有的 mRNA 则不再被翻译。果蝇幼虫的唾液腺细胞中也存在这一基因翻译水平的调控机制。

三、激素对特定 mRNA 稳定性的影响

在激素诱导下常合成一些分化产物。在这种情况下,有时激素并不是提高某一基因的转录水

平，而是在翻译水平上起作用，例如哺乳动物授乳期酪蛋白的合成。酪蛋白是乳汁中主要的磷蛋白，是乳腺上皮细胞的分化产物。乳腺在几种激素的连续作用下才能做好泌乳的准备，由催乳素负责调控泌乳过程。催乳素使酪蛋白 mRNA 的转录只增加 2 倍，其主要作用是稳定酪蛋白 mRNA。催乳素以某种方式延长酪蛋白 mRNA 的寿命，使它的寿命比细胞中大多数其他 mRNA 长 25 倍，使每一酪蛋白 mRNA 进行更多次的翻译。这样从每一酪蛋白 mRNA 可以合成比正常情况更多的酪蛋白分子。除了催乳素之外，其他激素也能提高某些特定 mRNA 的稳定性，表 19.1 显示几种激素对特定 mRNA 稳定作用的影响。

表 19.1　几种激素对特定 mRNA 稳定作用的影响

mRNA	细胞或组织	调控因子	半寿期/h	
			正影响	负影响
卵黄生成素	爪蟾肝	雌性激素	500	16
蛋白素	爪蟾肝	雌性激素	10	3
卵黄生成素	鸟类肝	雌性激素	22	2.5
Apo VLDL II	鸟类肝	雌性激素	26	3
酪素	大鼠乳腺	催乳素	92	5
生长激素	大鼠脑垂体培养细胞	地塞米松和甲状腺素	20	2
胰岛素	大鼠胰岛细胞	葡萄糖	77	29
卵清蛋白	母鸡输卵管	雌性激素，孕酮	24	2～5

第二节　早期发育中母体效应因子的影响

一、早期发育母体效应因子调控的证据

大多数动物的合子基因组并不是受精后就立即表达，胚胎早期的发育主要由卵母细胞中的母体效应因子(maternal－effect factor)所控制。许多实验证明胚胎发育最初阶段是母性的特征占统治地位，在随后的发育中才转向父性的或杂种的特征。科学家早就注意到蜗牛的卵裂方向由母体效应因子决定，其卵母细胞质中含有一种因子，决定卵裂极向右或向左旋转。用海胆 *Lytechinus* 的精子使海胆 *Cidaris* 的卵受精，两种海胆杂交后代的初级中胚层细胞平均数由海胆卵子的品种决定(表 19.2)，在原肠内卷和中胚层间质形成的时间方面的特征完全遵循母性的发育模式，父性基因的作用最早要到骨骼细胞的定位时才能看到(表 19.3)。

表 19.2　海胆杂交后代由母体效应因子控制初级中胚层分化的细胞数统计

卵子	×	精子	初级中胚层细胞平均数
Echinus		Echinus	55±4
Spherechinus		Sperechinus	33±5
Spherechinus		Echinus	35±5
Strongylocentrotus		Strongylocentrotus	49±3
Spherechinus		Strongylocentrotus	33±3

表 19.3 海胆 *Lytechinus*(♂)海胆 *Cidaris*(♀)杂交后代的发育特征

海胆种名	原肠内陷的时间/h	初级中胚层形成时间/h	初级中胚层来源
Cidaris(♀)	20～33	23～26（内卷后）	原肠顶部
Lytechinus(♂)	9	8（内卷前）	原肠基部和边缘
Cidaris(♀)× *Lytechinus*(♂)	20	24（内卷后）	原肠基部和边缘

关于早期发育受母体效应因子调控的另一些证据来自于去核实验。如果在受精后将一个受精卵的核去掉，就能研究在缺乏新合成 mRNA 的情况下发育能进行到什么阶段。去核可以通过物理方法、化学方法或遗传学方法等来完成。Harvey(1940)用物理方法移除海胆卵的核，再用化学方法激活去核卵，这些去核卵同样能进行卵裂并形成无囊胚腔的不正常囊胚。蛙的无核卵也同样能进行卵裂并继续发育到囊胚中期(图 19.3)。在这种情况下，尽管这些胚胎细胞没有新的 mRNA 转录，但是由于存在贮藏的 mRNA，在发育开始阶段都存在一个暴发式的蛋白质大量合成。海胆的暴发式蛋白质合成发生在受精时(或人工激活时)，激活的去核蛙卵在受精之后立即发生蛋白质合成，而且合成蛋白质的数量和种类都与正常受精卵相同。

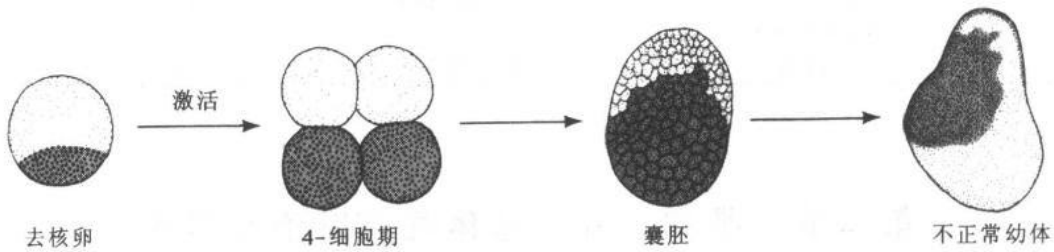


图 19.3 蛙卵在无核的情况下也能进行卵裂并发育到囊胚中期，但是不能发育成为正常幼体

二、贮藏性 mRNA 的发现

Brachet 等(1963)和 Denny、Tyfer (1964) 最早发现卵母细胞通过贮藏的 mRNA 调控早期发育。海胆去核卵激活后能进行正常卵裂，并以与正常受精卵相当的速率合成蛋白质。在这些细胞中没有任何卵母细胞胚胎基因的转录发生。细胞内这些新合成的蛋白质也不是线粒体 DNA 的编码蛋白，而是卵母细胞贮藏 mRNA 翻译的产物。卵母细胞含有大量贮藏 mRNA，直到受精后才进行翻译。由于放线菌素 D 可以抑制 RNA 合成，更温和的模拟去核方法是利用放线菌素 D 处理。将受精卵放入有放线菌素 D 的溶液中可以抑制转录发生。当海胆卵经过足够量的放线菌素 D 处理后，94％的 RNA 合成被抑制，胚胎仍能发育至囊胚且蛋白质合成速率与正常胚胎相同；如果将受精卵用抑制翻译的化学药物或放线菌酮处理时，胚胎发育不能进行。这些证据表明，直到囊胚期的发育依赖于贮藏的mRNA而并非预先合成的蛋白质。虽然用放线菌素 D 处理的受精卵与正常受精卵第一次暴发式蛋白质合成情况一致，但是经过处理的胚胎在囊胚期不再发生第二次暴发式蛋白质合成，因为第二次蛋白质暴发式合成所需的 mRNA 是合子胚胎基因的转录产物。有证据表明编码孵化酶的基因是由合子胚胎基因新转录的产物，该酶的功能是降解包围着囊胚的受精膜。如果用放线菌素 D 抑制合子胚胎基因的转录，结果海胆囊胚外胚层细胞不能产生孵化酶。因此放

线菌素 D 处理过的胚胎可以发育到囊胚期，但是不能再继续发育。用物理方法、化学方法和遗传学方法去除受精卵核的实验都清楚地说明，卵母细胞的细胞质中确实存在贮藏性 mRNA，它们可以支持早期的胚胎发育，但是只能够使发育进行到囊胚期。这些贮藏性 mRNA 在转录后并不立即进行翻译，其中大部分在细胞质中保持惰性状态，直到受精或更晚的时期才翻译。正像大多数胚胎基因组只转录其许多基因中的小部分一样，卵母细胞也只翻译存在于其胞质中许多 mRNA 中的一部分。

三、卵母细胞贮藏性 mRNA 性质和位置

1. 卵母细胞中贮藏 mRNA 的种类

科学家们估计了卵母细胞 mRNA 的复杂性，多种动物的每个卵母细胞有大约 20 000 到50 000 种不同种类的 mRNA，每种大约 1 600 个拷贝。在已知的细胞类型中，卵母细胞 mRNA 复杂性最高，但是关于这些 mRNA 的性质了解较少。有些 mRNA 并不为卵母细胞所利用而只是贮藏在那里。PCR 检测和 RNA 酶分析也证实这种 mRNA 的存在。它们贮藏在卵母细胞中，一直到卵母细胞成熟至即将排卵之前、排卵时、受精和/或早期发育时才开始翻译。有些 mRNA 的产物是卵裂需要的蛋白质，因为卵裂期胚胎需要合成大量的染色质单体、细胞膜和细胞骨架成分；另一些 mRNA 编码决定细胞命运的蛋白质。核糖核苷酸还原酶基因的表达是非常有趣的。该酶由两个亚基构成，酶的大亚基作为已翻译的蛋白质在卵母细胞的胞质中贮藏，而小亚基却以未翻译的母源性 mRNA 的形式贮藏。只有在受精后，小亚基的 mRNA 被翻译，新合成的小亚基才能与早已存在的大亚基结合形成有功能的酶。在海胆的早期发育阶段，细胞分裂的速率和模式不受胚胎基因组表达的影响，而需要贮藏的母源性 mRNA 不断地合成蛋白质来支持。由贮藏的 mRNA 合成的一类细胞周期蛋白(CYCLIN)调控细胞分裂。CYCLIN 在细胞分裂时被降解，在每次卵裂完成之后必须由贮藏的mRNA再重新合成。当胚胎发育到接近原肠胚末期时，利用贮藏 mRNA 合成的 CYCLIN 的量已减少。

2. 贮藏 mRNA 的定位

在卵母细胞中，有些种类贮藏 mRNA 的分布是不均一的。已经知道有些动物的某些 mRNA 在细胞质中定位分布，如蜗牛、果蝇、被囊类动物、海胆和蛙等。虽然大多数母源性 mRNA 在未受精的爪蟾卵中均匀分布，但有些贮藏 mRNA 是定位分布于细胞质的动物极或植物极。如果将卵母细胞的 poly(A) - RNA 提取出来，用反转录酶和 DNA 聚合酶将这些 RNA 转变成双链 DNA，并插入克隆载体里面，分别在大肠杆菌中扩增。共得到大约 2×10^6个克隆。将这些克隆，即爪蟾卵母细胞文库的 DNA 转移到两张滤纸上，在一定条件下变性以得到单链 DNA。同时分别用卵的动物极或植物极部分提取 poly(A) - RNA，反转录后用以制备放射性标记的 cDNA 探针。将具有 DNA 的两张滤纸分别与动物极或植物极的 cDNA 探针杂交。检测自显影结果，发现大多数克隆结合了等量的动物极和植物极 cDNA，说明这些 mRNA 是平均分布的。另外还有大约 1.2% 的克隆只结合动物极的 cDNA 探针，0.2% 的克隆只结合植物极的 cDNA 探针。再用这些动物极或植物极特异性 DNA 克隆制备放射性标记探针，利用 Northern 印迹法就可以检测出其 mRNA 的分布。将整个卵、动物极或植物极提取的 RNA 进行凝胶电泳，并将电泳分离的 RNA 转移到硝酸纤维素膜上，再与各区域特异性放射性标记 DNA 探针进行杂交。用此方法研究的结果显示，镶嵌型卵和调整型卵的卵质中都存在卵母细胞期合成的 mRNA。在卵子发生中卵母细胞合成的大量 mRNA，贮藏在

卵质中供早期发育阶段利用。

第三节 翻译和翻译后调控的机制

一、卵母细胞翻译控制机制的假说

目前关于卵母细胞翻译控制的机制有多个假说，其中有的涉及 mRNA 的无效性，也有的涉及翻译的效率。大多数动物使用不止一种方法来调控其卵母细胞的翻译。最基本的问题是 mRNA 如何结合到多聚核糖体上。

我们已经知道，海胆未受精卵只有低于 1% 的核糖体形成多核糖体。在海胆卵裂期，卵裂球中却有接近 20% 的核糖体形成多核糖体。此时并无新的 mRNA 合成，只是原来早已存在的 mRNA 与多聚核糖体结合。大量证据显示，卵母细胞的核糖核蛋白(RNP)中的 mRNA 在以后的发育阶段与胚胎细胞的多核糖体结合。Young 和 Raff (1979)报道本来存在于海胆卵母细胞 RNP 中标记的 RNA，随后进入分裂球多核糖体。Rosenthal 等(1980)把从卵母细胞和胚胎细胞提取的 mRNA 放到无细胞翻译体系中同样能合成蛋白质。但是，卵母细胞多核糖体中的 mRNA 与胚胎细胞多核糖体中的 mRNA 并不完全相同。胚胎细胞中重要的特异性蛋白质的 mRNA，在胚胎细胞中与多核糖体结合并翻译，而在卵母细胞质中却以不翻译的 RNP 形式存在。即随着发育进行 mRNA 从不翻译的 RNP 形式转变成为与多核糖体结合的有翻译活性的形式。相反，卵母细胞特有蛋白质 mRNA 在卵母细胞中存在于多核糖体上而以后也并不与胚胎细胞的多核糖体结合。在果蝇和爪蟾中也观察到同样的情况，卵母细胞中贮藏形式的 mRNA，在以后的发育阶段被“招募”到多核糖体上去。关于在卵母细胞质中沉睡的 mRNA 如何突然获得了翻译的能力有如下假说。

1. 掩蔽母源性 mRNA 假说。

这一假说认为，母源性 mRNA 在卵母细胞中被蛋白质物理性地掩蔽起来，无法附着于核糖体。一旦卵母细胞成熟或复性，起掩蔽作用的蛋白质脱落使 mRNA 能够被翻译。mRNA 总是与蛋白质结合的，但与之结合的蛋白质的种类可以改变。Spirin(1966)认为卵母细胞 mRNA 贮藏于 RNP 中被核糖核蛋白复合体掩蔽，由于它们不能与核糖体连接而不能被翻译。受精时可能由于胞质中离子浓度的变化，掩蔽 mRNA 的蛋白质被释放，mRNA 去掩蔽而可以起始翻译。已有不少支持这一假说的证据。Infante 和 Nemer(1968)发现未受精的海胆卵含有 RNP 颗粒，其沉降速度比核糖体慢得多。Gross 等(1973)发现这些颗粒中含各种各样的 mRNA。Jenkins 等(1978)报道未受精卵贮藏于 RNP 里的 mRNA 不能翻译，但如果将这些 RNP 放在模拟受精后离子状态的溶液中，这些 RNA 就同样能被翻译。Raff(1980)认为受精时钠离子的进入可能使 RNP 颗粒变得不稳定，因而允许其中的 mRNA 被翻译。核糖核苷酸还原酶小亚基和 cyclin A 的 mRNA 在卵母细胞中被高度约束不能进行翻译，这种情况一直维持到受精。但是有两种方式可以使它们的 mRNA 去掩蔽：一是在高盐浓度(0.5 mol/L KCl)条件下可以进行蛋白质翻译，其次是移去这两种 mRNA 的 3′末端 UTR 中一个特定的碱基也可以使它们进行翻译。因为这两种 mRNA 的 3′末端 UTR 中有一些非常相似的区域，可能构成了一个 M_r 82×10^3 蛋白质的结合位点，使一种蛋白质可结合到它们 mRNA 的 3′末端 UTR 上。这种蛋白质受精时被磷酸化，可能磷酸化使这种蛋白质不再能阻止 mRNA

的翻译。另外，受精时被激活的一个激酶可能负责解除对翻译的阻遏。母源性 mRNA 被掩蔽假说的另一个证据来自对核糖体 RNA 的研究。爪蟾 5S rRNA 与其转录因子 TFⅢA 一起贮藏在 RNP 复合物中。这种结合使 5S rRNA 被贮藏于一种非活性形式，直到它后来被结合进新的核糖体。两栖类的卵母细胞中含有一些蛋白质，专一性地与某些 mRNA 结合而不与另外一些 mRNA 结合，这些蛋白质是否从功能上掩蔽了母源性 RNA 尚有待于探讨。

2. poly (A) "尾巴"假说或多聚腺苷酸化假说

这是关于卵母细胞中的贮藏性 mRNA 调控早期发育的最有力的一个假说。卵母细胞基因表达在翻译水平的调控是非常重要的。蛙和小鼠的卵母细胞分别在它们细胞质里贮藏了大量的不同种类的 mRNA，但它们在成熟过程中翻译这些 mRNA 的时间是不同的。有资料表明改变 poly (A) "尾巴"对卵母细胞 mRNA 翻译时间的选择十分重要。而 poly (A) 的变化是由 mRNA 的 3′末端 UTR 调控的。3′末端 UTR 可以通过控制 poly (A) "尾巴"的大小等调控卵母细胞 mRNA 的翻译效率。在卵母细胞中 poly (A) "尾巴"的缩短可抑制其翻译能力。当然这种抑制常常是有选择性的也是暂时性的。那些用于卵母细胞生长和代谢的 mRNA 保留较长的 poly(A)"尾巴"并且合成后立即翻译；而那些贮藏在卵母细胞中的、在排卵时和受精后才翻译的 mRNA，一般在进入细胞质时就立即去掉了它们 poly(A)"尾巴"的大部分序列，仅保留 15 到 90 个腺苷酸残基。到卵母细胞成熟时发生相反的过程，那些已被活跃翻译过的 mRNA 则去掉它们的 poly(A)"尾巴"丧失翻译功能；而那些被贮藏的 mRNA 重新获得较长的 poly(A)"尾巴"(150～600 个腺苷酸)并被翻译。

在哺乳动物未成熟的卵母细胞中，进行翻译的 mRNA 有一个标准的 AAUAAA 多聚腺苷酸化位点，它们保留着 poly(A)"尾巴"，直到卵母细胞成熟时再启动。届时它们的"尾巴"被去多腺苷酸化，不能翻译。那些将要贮藏在未成熟卵母细胞质中等卵母细胞成熟之后才翻译的 mRNA，进入细胞质后 poly(A)"尾巴"就被剪除。这些 mRNA 在 3′末端 UTR 中有 2 个信号序列：多聚腺苷酸化序列 AAUAAA 和一个被称为多腺苷酸化控制子序列(ACE)或细胞质 poly(A)因子(CPE)。另外，在小鼠和蛙中有相同的序列 UUUUUAU。一旦卵母细胞的成熟过程再启动这些贮藏的转录本时，后者就重新多聚腺苷酸化，变得具有翻译活性。看来较长 poly(A)"尾巴"的获得，对于贮藏的卵母细胞 mRNA 开始翻译是很关键的。

爪蟾卵母细胞的情况与哺乳动物很相似，但也有一些变化。与哺乳动物卵母细胞的 mRNA 一样，长的 poly(A)"尾巴"对 mRNA 的翻译是必需的。卵母细胞成熟时再发生 mRNA 翻译情况的转变。当生发泡破裂开始进行减数分裂时释放出去腺苷酸化的因子。那些没有 ACE 序列的 mRNA 被去多腺苷酸化，而具有 ACE 序列的 mRNA 却能继续保持多聚腺苷酸化。多聚腺苷酸化序列和 ACE 序列对这些 mRNA 翻译的激活都是必需的，但 poly(A)"尾巴"本身的存在并不足以促成翻译，而 poly(A)化的过程对 mRNA 的翻译却十分重要。注射进卵母细胞带有poly(A)"尾巴"的外源 mRNA 并不能被翻译。可能 poly(A)化的过程同时移去了原先掩蔽着 mRNA 的抑制蛋白。不同的 ACE 序列间存在一些差异，这些差异可能引起了不同方式的 poly(A)化。在不同的时间有特异性因子结合不同的 ACE 序列。Paris 等(1991)报道卵母细胞中一个 M_r 58×10^3 的蛋白质与 ACE 序列结合并能被 cdc2 激酶磷酸化。磷酸化是卵母细胞成熟时一组 mRNA poly(A)化所必需的。在受精前孕酮刺激卵母细胞重新启动减数分裂，由此触发的一系列反应激活了 cdc2 激酶。这一结果显示发育的程序可以选择调控哪一组 mRNA 进行翻译。

二、关于早期发育的几点启示

1. 秀丽新小杆线虫发育的分子调控者——3′末端非翻译区

目前,人们对 mRNA 3′末端非翻译区的兴趣十分浓厚,因为母体效应基因 mRNA 的这一区域存在控制早期发育十分重要的调控因子。mRNA 3′末端除了在受精卵里调控 mRNA 与核糖体的结合过程之外,已知有几种 mRNA 的 3′末端非翻译区对于发育系统的时空调控也具有重要作用。秀丽新小杆线虫(*C. elegans*)配子的决定是一个很好的例子。这种动物隐蔽 mRNA 的 3′末端非翻译区起着格外引人注目的作用。这种线虫虽然显示雌性化的身体,实际上是两性的,在不同的时间既产生精子又产生卵子。最先产生的生殖细胞分化为精子,精子贮藏在子宫中供以后需要时利用。第四次蜕皮以后幼虫发育为成虫,生殖细胞停止精子的分化而开始分化成为卵子。卵子最后将与贮藏的精子结合受精。生殖细胞向哪个方向发育成为精子还是卵子,这是由不同的翻译机制进行调控。TRA-2 蛋白是卵子和雌性体细胞发育必需的蛋白质。当 *tra-2* mRNA 的翻译受到抑制时生殖细胞发育为精子,*tra-2* mRNA 翻译的抑制启动精子的形成过程。其 mRNA 3′末端非翻译区有两个 28 个核苷酸区域,每个可结合一个未知的阻遏蛋白,推测这种阻遏蛋白在幼虫期合成,与精子发生耦联。如果这两个区域突变,*tra-2* mRNA 的翻译不能阻遏,也就没有精子形成。此外,从精子发生向卵子发生的转变也需要 *fem-3* 基因通过其 mRNA 3′末端非翻译区抑制翻译。FEM-3 蛋白对精子产生和雄性体细胞的分化十分重要。*fem-3* 基因的转录可被 TRA-2 抑制,同时已合成的 *fem-3* mRNA 翻译的抑制也为转变过程所必需。这种翻译的抑制受 *fem-3* mRNA 3′末端非翻译区上结合一个翻译阻遏蛋白的影响。因此对于雌雄同体的线虫,精子发生的启动和向卵子发生的转变都受到 3′末端非翻译区产生的翻译抑制机制的调控。至于它们抑制翻译的详细机制尚不清楚。

2. 秀丽新小杆线虫幼虫基因表达的调控

秀丽新小杆线虫具有一套格外精细的幼虫基因表达调控机制。LIN-14 是个高水平的转录因子,由它确定早期幼虫器官原基的蛋白质合成。然而尽管 *Lin-14* 的 mRNA 可在整个早期发育阶段检测到,在此时期以后 LIN-14 蛋白就不再能检测到。秀丽新小杆线虫可以通过激活 *Lin-14* 基因来阻止 LIN-14 蛋白的合成,该基因编码的蛋白质可以结合到 *Lin-14* mRNA 的 3′末端非翻译区并阻止其翻译。*Lin-14* 无功能的突变体 LIN-14 蛋白持续合成,但是发育被阻滞于早期。

3. 卵母细胞中 mRNA 的定位

事实上不仅贮藏 mRNA 的翻译活动受到其 3′末端 UTR 的调控,其他 mRNA 在卵母细胞中的定位也受 3′末端 UTR 的调控。爪蟾卵的 *Vg 1* mRNA 通过其 3′末端 UTR 上一个 340 核苷酸的序列定位到植物极,与卵母细胞的微管和微丝结合。如果这段序列缺失,*Vg 1* mRNA 就不能定位于植物极。如果将这一序列置于其他 mRNA 上,那些 mRNA 就会改变原来的定位。果蝇几个 mRNA 的正确分布对前后极性正常的形成十分重要。*bicoid* 的 mRNA 必须位于卵母细胞的前极,而 *oskar*, *nanos*, *cyclin* B 必须位于后极,这些 mRNA 通过各自的 3′末端 UTR 被定位到合适的位置。*bicoid* mRNA 定位于前极需要 *exuperantia*(*exu*)基因的表达,*exu* 基因表达产生蛋白质 EXU,后者使 *bicoid* mRNA 的 3′末端 UTR 结合到前极的微管上面。

4. 维持分化状态

3′末端 UTR 可能对某些组织分化的维持也是必需的。肌肉细胞的肌钙蛋白Ⅰ、原肌球蛋白和 α－肌动蛋白的 mRNA 不仅编码肌肉特有的蛋白质，而且能够抑制处于分化进行过程中的肌肉细胞回到脱分化的增殖状态。Rastinejad 和 Blau (1993) 揭示这些 mRNA 的 3′末端 UTR 对维持体外培养的肌肉细胞的分化状态十分重要。这些 3′末端 UTR 可能与促进生长或抑制分化的蛋白质结合，Myo D 家族等转录因子可能负责肌肉分化的启动，而肌肉特异性 mRNA 的 3′末端 UTR 可能对维持分化是必需的。

5. 翻译效率假说

前述的翻译调控模型认为，翻译体系可以有效地翻译任何 mRNA，只是 mRNA 和核糖体被物理因素或化学因素分开了。事实上最初卵母细胞中存在的较低 pH 微环境就可以阻止蛋白质合成。由于海胆卵受精时发生急剧的氢离子释放，使卵母细胞质的 pH 上升，蛋白质合成开始。Winkler 和 Steinhardt (1981)建立了海胆卵无细胞翻译体系进行模拟实验，通过透析改变或维持翻译体系的 pH，并用放射性缬氨酸的掺入量来测量蛋白质合成。在不加任何外源性 mRNA 的情况下，将 pH 从卵母细胞水平(pH6.9)提高到合子水平(pH7.4)，即产生类似受精时的暴发性蛋白质合成。Hille 等 (1985, 1986) 认为 pH 的变化激活了卵质中的翻译机制。因为从未受精卵和受精卵提取核糖体和起始因子，比较它们在翻译体系中的效率，受精卵的核糖体和起始因子明显地比未受精卵的活跃。如果将外源性珠蛋白 mRNA 注射进未受精卵，并不引起未受精卵蛋白质合成总量的增加，因为在珠蛋白 mRNA 翻译的同时，其他 mRNA 翻译量下降。提示翻译体系中合成蛋白质的量是有限的，其限制因子可能是起始因子。如果向未受精卵的细胞裂解物中添加 GTP 结合起始因子 eIF2B 或帽子结合蛋白 eIF4B，可以引起翻译效率的提高。可能卵细胞质的 pH 上升或多聚腺苷酸化使 mRNA 去掩蔽，同时也使起始因子激活。当 pH 提高时结合到核糖体上的 mRNA 可增加 3 倍。

6. 其他控制体系

在其他控制体系中，首先应该考虑 mRNA 的 5′末端是否具有甲基化帽子对有效翻译进行的调控。mRNA 的 5′末端和 3′末端对于有效的翻译都是必需的。我们已经讨论了 3′末端 poly (A) "尾巴"的不同长度可以引起差别的 RNA 翻译。为了有效的翻译，几乎所有真核生物的 mRNA 都需要在 5′末端加一个 7－甲基鸟嘌呤帽子。某些蛾类通过 5′末端帽子部位的变化对翻译进行控制。蛾卵母细胞贮藏的 mRNA 在 5′末端具有未甲基化的帽子，尽管这些 mRNA 的 5′末端存在鸟苷酸但尚未与甲基连接，这种 mRNA 在无细胞体系中不能翻译。然而当复性时这些 mRNA 在卵母细胞中发生迅速的甲基化，具有完整帽子的 mRNA 结合到核糖体上并起始翻译。人工合成 mRNA 的一些研究结果显示，5′末端非翻译区的二级结构(如发夹环)也能对卵母细胞中 RNA 翻译时机的选择进行调控。

另一种控制体系是暂时掩蔽的 mRNA。一些研究者对卵母细胞存在于 RNP 中的 mRNA 都不能被翻译的证据提出了质疑，他们认为可能是翻译体系被分隔开来阻止了存在于 RNP 中 mRNA 靠近核糖体。海胆卵母细胞组蛋白 mRNA 的翻译存在这种调控机制，组蛋白 mRNA 不在细胞质中而是位于未受精卵的生发泡内。只有当受精过程末期雌性原核破裂，组蛋白 mRNA 才能进入细胞质。其他大多数 mRNA 的翻译可能不存在此调控机制，因为存在于未受精卵生发泡中 mRNA 的量低于 mRNA 总量的 0.1% 。此外有些母源 mRNA 和游离的核糖体结合到细胞骨架上，提示细胞骨架也可以起分隔 mRNA 和核糖体的作用。所有这些可能的翻译控制机制都为生物有机体

所采用，在一个卵母细胞中存在调控其贮藏 mRNA 翻译的多种控制机制。

三、胚胎基因组的激活

发育事件发生的情况在不同种群动物之间有很大的差异。用同样时间例如受精后 24 h 进行比较，此时，果蝇幼虫已经孵化并忙碌地进食，而两栖类的发育处于原肠胚晚期或神经胚早期，海胆才发育成囊胚晚期或原肠胚早期，哺乳类的发育更缓慢，小鼠刚完成第一次卵裂而人类大约受精后 30 h 才进行第一次卵裂。不同动物早期胚胎发育中，由细胞质母体效应因子的控制转向胚胎基因组控制的时间和速度也不同。大多数动物最初的胚胎发育由细胞质母体效应因子控制而胚胎基因组不起作用，也有一些动物受精后胚胎基因组就立即开始转录，在第一个细胞周期中就有新的胚胎基因转录产物出现。

爪蟾整个卵裂期的胚胎发育似乎不依靠胚胎基因组的转录产物，仅依靠卵母细胞质来源的贮藏物质。这种情况可以一直维持到囊胚中期，第 12 次卵裂后是一个转折点，此时胚胎基因组开始转录，在此之前胚胎基因组一直是不活跃的。各种基因开始转录的时间不同，最早被激活的基因由卵母细胞母体效应因子所激活。OZ－1 蛋白是发育中卵母细胞产生的一种转录因子，它能结合一种 14 bp 的 DNA 序列，这种序列存在于在囊胚中期转折点时期或转折点后不久就转录的几个基因的启动子序列中。如果将其他基因例如爪蟾 β－珠蛋白基因插入这一序列，β－珠蛋白基因就能在囊胚中期转折点表达；反之，当这一序列突变时则不能表达。很可能 OZ－1 蛋白本身也需要其他因子的作用才能被激活。

在囊胚中期转折点胚胎基因组由母体效应因子激活的观点得到美西螈 O 基因突变研究结果的支持。美西螈 O 基因突变是一种母体效应突变，其雌性纯合子产的卵子可以受精，而且直到卵裂晚期和囊胚早期的发育完全正常。到囊胚中期，其有丝分裂较正常胚胎缓慢但继续发育形成一个胚孔背唇，以后发育却阻滞于原肠期。胚胎能正常发育至囊胚中期，也有一次 RNA 和蛋白质的暴发式合成。但是由 O/o 雌性个体产的卵子受精后虽然能够发育到此时期，却没有暴发式的 RNA 和蛋白质合成。事实上其 RNA 和蛋白质合成的模式与激活的去核卵发育的情况相同。这种胚胎缺少在囊胚中期激活胚胎基因组的因子，所以仅发生那些母体效应因子的 mRNA 支持的发育过程。两栖类卵母细胞中有足够的贮藏物质，可使胚胎进入原肠期，然而没有新 RNA 的合成不能再出现进一步的发育。

果蝇也有一个囊胚中期转折点，在此之后由母体效应因子 RNA 和蛋白质控制的发育转向胚胎基因组表达产物的控制。这种转变最早在第 10 次核分裂后出现，这是第一次有 G_2 期的细胞周期。以后 G_2 期的时间开始延长，从第 10 次分裂后的 10 min 延长到第 14 次分裂以后的 60 min。在第 14 个细胞周期的 G_2 期出现胚胎发育中基因组最高的转录活性。Edgar 和 Schnbiger (1986) 报道，果蝇胚胎基因在第 10 个细胞周期时已具备转录能力，但大多数基因还需要一个较长的 G_2 期才能被激活。这种高转录活性可以通过放线菌酮延长 G_2 期而引起其提前产生，但是这种影响最早只能在第 10 个细胞周期起作用，因为大多数基因在第 10 次细胞周期时已经能被激活，但是它们直到第 14 个细胞周期时才开始转录。

海胆没有十分明显的囊胚中期转折点。虽然海胆去核卵可以正常发育到囊胚期，而且囊胚中期细胞核中也有转录量骤增的情况，但事实上海胆细胞胚胎基因组在早期发育中似乎没有不起作用的时候，甚至在雌、雄原核融合之前就已经出现，低水平的转录，包括新的组蛋白基因转录本。这

些新转录的 mRNA 与母体效应因子 mRNA 一起控制发育。最初四次卵裂的染色单体主要由贮藏在卵母细胞质中的组蛋白和从母源性 mRNA 合成的组蛋白参与构成。但从 16－细胞期以后，大多数组蛋白由胚胎基因的转录本合成。这种控制方式与两栖类形成了鲜明的对比，两栖类卵母细胞中有大量贮藏的母体效应因子组蛋白和组蛋白 mRNA 可供形成上千个早期胚胎细胞利用。

哺乳类、海鞘、线虫和软体动物胚胎在第一个细胞周期内就开始胚胎基因的转录。小鼠 2－细胞期胚胎基因组极为活跃，大部分蛋白质在 2－细胞期的合成量比合子增加五倍以上。如果在具有 α－鹅膏蕈碱的条件下培养小鼠胚胎，发育将阻滞于 2－细胞期。小鼠母体效应因子 mRNA 只能维持两天，以后很快被降解，由胚胎基因转录的 mRNA 编码新的蛋白质以代替母体效应因子信息控制发育。在大多数例子里，精子来源的染色体与卵子来源的染色体大约同时被激活。人类胚胎基因 mRNA 合成最早被检测到是在 4－细胞期，用转录抑制剂处理，可使发育阻滞于 4～8－细胞期。牛和绵羊胚胎基因的转录活动出现于 8～10－细胞期。

总之，一般最初的发育都由贮藏在卵母细胞胞质中的 mRNA 和蛋白质控制。除哺乳类和其他少数种群之外，胚胎基因组在母源性 mRNA 降解之前很久就被激活，由两套 mRNA 同时进行翻译和控制发育。当母体效应因子 mRNA 被降解后则完全由胚胎基因组表达产物控制发育。

四、血红蛋白翻译水平的控制

基因表达调控的一个重要作用是协调基因组不同区域的几个表达产物的产生。当一个发育中的红细胞合成血红蛋白时，必须保证 α－珠蛋白链、β－珠蛋白链和血红素按照 2:2:4 的比例合成。偏离这一比例的任何较大的偏差都会引起严重的疾病。血红素分子具有调控血红蛋白各成分按比例合成的功能。它通过两条途径来完成调控。首先，停止合成多余的血红素，即尚未与珠蛋白类蛋白质结合的血红素。这是通过失活合成血红素途径中的第一个酶，δ－氨基－γ－酮戊酸合成酶(DALA 合成酶)来实现的。因此当血红素分子比与它结合的蛋白质分子多时就不再有血红素分子合成。其次，多余的血红素可刺激珠蛋白的产生。将血红素(包括其氧化形式，氯高铁血红素)加入一个含有翻译所需要的所有因子的无细胞体系中时，珠蛋白的合成可大大提高。因此，无珠蛋白结合血红素时，多余的血红素就关闭自身的合成并促进更多的珠蛋白产生。

为研究血红素对珠蛋白合成的刺激作用，可以向无细胞翻译体系中添加那些与核糖体松弛结合的蛋白质来模拟。由于这些溶液中富含翻译起始因子 2 (eIF2)，在无细胞体系中仅血红素不足的细胞裂解物可恢复其蛋白质合成水平。eIF2 负责与起始 tRNA 结合，并将它组合到 40 S 核糖体亚基上。为了解 eIF2 和血红素之间的关系，研究者们曾向补充了血红素的翻译体系中添加血红素不足的细胞裂解物，发现一定量的血红素不足的细胞裂解物可以抑制整个体系的珠蛋白合成，提示血红素不足的细胞裂解物中存在一种抑制因素。以后发现起抑制作用的成分有酶活性并含有一个能使 eIF2 磷酸化的激酶。在正常情况下，一旦核糖体亚基结合到一起，eIF2 与 GDP 的复合物就会释放出来。eIF2 要在起始反应中再次使用就必须有 eIF2B 的帮助。eIF 2B 将 GDP 转变为 GTP，形成的 eIF2－GTP 复合物可以进入翻译的再一轮起始。然而当 eIF2 的亚基被磷酸化后，eIF2B 仍可与之结合但不能再解离。最终，当所有的 eIF2B 都结合进了这种复合物时翻译就停止。也就是说血红素通过以下方式调控珠蛋白的合成：首先在无血红素的情况下，一个特定的蛋白激酶使 eIF2 磷酸化。其次磷酸化的 eIF2 与 eIF2B 结合并不再释放。当所有的 eIF2B 都被固定在这种复合物里时，翻译停止。此外多余的血红素能与特定蛋白激酶结合并使之失活，失活的激酶不能再使

eIF2 磷酸化于是翻译进行。所以只要有血红素存在,珠蛋白的合成就可以继续进行。

事实上珠蛋白合成的翻译水平调控机制并非如此简单。每个二倍体细胞中有四个活跃的 α - 珠蛋白基因,但是只有 2 个活跃的 β - 珠蛋白基因。如果每个基因以相同的速率转录和翻译可以预计 α - 珠蛋白分子将会是 β - 珠蛋白分子的二倍。事实上,α - 珠蛋白 mRNA 与 β - 珠蛋白 mRNA 的比例为 1.4 :1,而相应蛋白质的比例为 1:1,蛋白质的对应关系主要涉及翻译水平的调控。Kabat 和 Chappell(1977)认为 α - 珠蛋白 mRNA 与 β - 珠蛋白 mRNA 要竞争起始因子,而 β - 珠蛋白 mRNA 似乎是一个较有力的竞争者,它可以更有效地为起始因子识别,因此翻译的频率更高一些。如果两种 mRNA 数量相等且仅提供严格限制的起始因子,那么合成出来的蛋白质中只有 30% 是 α - 珠蛋白。如果向裂解细胞得到的 α - 珠蛋白和 β - 珠蛋白 mRNA 中直接加入过剩的起始因子,所有 mRNA 以相等的效率进行翻译,按 1.4:1 比例合成 α - 珠蛋白和 β - 珠蛋白。在细胞内的翻译体系中帽子结合蛋白作为起始因子负责识别这两种 mRNA,α - 珠蛋白和 β - 珠蛋白 mRNA 的 5′末端有明显的区别,由 5′末端引导序列的结构影响翻译效率。因此从翻译的起始步骤就建立了 α - 珠蛋白、β - 珠蛋白和血红素的适当比例。虽然血红蛋白的合成还涉及转录水平和 RNA 加工水平上的调控,但最终血红蛋白分子是通过翻译水平上精细的调节构建起来。

五、翻译水平调控的广泛性

翻译水平的调控无疑是发育基因表达调控的一个重要机制,而且广泛地存在于许多动物的多种基因表达之中。前面谈到的一些例子已显示出其重要性,如许多动物受精后的暴发式蛋白质合成,血红蛋白各成分合成的平衡,以及激素引起酪蛋白的合成等,在整个动物王国中有许多翻译水平调控的例子。海虾胚胎的再激活也是在翻译水平的调控,它们的胚胎发育中可以休眠很长时间,在休眠期间没有任何蛋白质合成。已发现这些胚胎存在一个蛋白质合成的抑制因子,即一种蛋白激酶。当蛋白质翻译再次被激活时功能性 eIF2 增加 20 倍。所以在海虾胚胎中可能使用了调控血红蛋白合成同样的机制。哺乳动物主要的两种铁结合蛋白——铁蛋白和转铁蛋白受体之间的调节机制也是翻译水平的调控。铁蛋白和转铁蛋白受体的 mRNA 都含有能结合铁应答结合蛋白(IRE - BP)的结构域。铁蛋白 mRNA 的 5′末端引导序列中有一个这种序列,而转铁蛋白受体 mRNA 在 3′末端非翻译区有两个这种序列。当细胞中铁含量很低时铁结合蛋白不能结合铁离子而呈现可结合 mRNA 的构象,与铁蛋白 mRNA 的引导序列结合可抑制铁蛋白 mRNA 翻译,阻止这种铁离子贮藏蛋白的合成。同时结合蛋白结合到转铁蛋白受体 mRNA 的 3′末端,可稳定 mRNA 使之能抗降解,进而合成更多的转铁蛋白受体,后者则运载更多的铁离子进入细胞。

六、RNA 编辑

RNA 编辑是指在已有的 RNA 分子上改变一个特定的碱基以改变遗传信息。最出人意料的翻译水平调控机制之一是在研究脱脂脂蛋白 B(Apo - B)基因表达的调控中发现的。Apo - B 蛋白是血清中脂载蛋白的成分,在粥样硬化的发生中起着重要作用。Apo - B48(48kDa)在肠道中合成,是吸收和转运饮食中胆固醇和甘油三酯必需的乳糜微粒的一个成分。Apo - B100(100 kDa)在肝脏细胞中合成,是极低、低和中等密度脂载蛋白的主要成分。Apo - B100 和 Apo - B48 这两种蛋白质由同一基因转录,而且未发现存在两种不同的 mRNA 或不同的 RNA 加工过程。对 *apo - B* cDNA 的分析发现,肝组织中的 *apo - B* mRNA编码全长的 Apo - B100 多肽,但肠道中的 *apo - B* mRNA

与肝中的相差仅一个碱基。由于发生了一个 C－U 的转换，使第 2153 位密码子上一个正常的谷氨酰胺密码子(CAA)变成了终止密码子(UAA)。这一改变造成在肠道中合成截短的蛋白质 Apo－B48。*apo－B* 基因的最初转录本似乎未被编辑，而 C－U 编辑可由细胞核内的一个因子完成。负责编辑的核蛋白因子迄今尚未确认，但通过改变那个被编辑的胞嘧啶附近序列的研究发现有 2 个序列对编辑至关重要。一个是在各种哺乳类中都保守的核苷酸序列，另一个是在其下游具有种属特异性的序列。可能有一种酶能够识别这两个序列并将催化位点置于那个特定的胞嘧啶上，使胞嘧啶脱氨基变成了尿嘧啶。在发现此现象之前，一般认为 mRNA 核苷酸序列一经转录就不会再发生改变。RNA 编辑是一个罕见的例外，而且通常只见于某些 mRNA。但是 Sommer 等(1991)报道 RNA 编辑的调控在哺乳类细胞发育中可以改变某些离子通道的钙离子透出率。

翻译水平的调控是动物发育中基因表达调控体系中一个重要和广泛应用的机制。这种机制可在特定时间激活已存在的 mRNA，也可调控不同的和相互竞争的 mRNA 的翻译比率。动物具有多种机制将 mRNA 贮藏于卵母细胞中供以后早期发育利用。

七、翻译后的调控

蛋白质合成以后变成有机体细胞和组织的组成成分。有的蛋白质可能参与细胞结构的形成，也可能参与细胞代谢或合成、分解其他成分的催化过程。不管属于哪种情况，个别的蛋白质已成为复杂的细胞和组织的一部分并在其中与其他成千上万种蛋白质发生联系，因此仍会发生一些变化。首先，一些新合成的未经进一步修饰的蛋白质是无活性的，这种修饰可能涉及蛋白质的某些抑制性片段的除去。很多蛋白质有前体，如胰岛素的 A 链和 B 链本来是连在一起的一条长链，通过剪切去除一段后才能成为两条链。同时也可能涉及一些能促进活性的化合物的结合，如晶体蛋白翻译后在 N 末端有一个很重要的修饰乙酰化；而鱼精蛋白翻译后必须磷酸化。其次，某些蛋白质可能被选择性地灭活。在有些情况下灭活涉及蛋白质本身的降解；另一些情况下灭活可能涉及与一个抑制性配体的结合。第三，有些蛋白质必须被运送到它在细胞内特定的目的地。细胞不是简单的酶的堆积，蛋白质经常被暂时局限于某些区域如膜、溶酶体、核或线粒体。第四，有些蛋白质需要与其他蛋白质组装成为功能单位。血红蛋白、微管和核糖体就是成千上万结合在一起形成功能蛋白质的实例，所以遗传信息的表达必须受到翻译后水平的调控。

参考文献

1 Busslinger M, Hurst J, Flavell R A. DNA methylation and the regulation of globin gene expression. Cell, 1983, 34: 197～206

2 Chaillet J R, *et al*. Parental－specific methylation of an imprinted transgene is established during gametogenesis and progressively changes during embryogenesis. Cell, 1991, 66: 77～83

3 Decker C J, Parker R. Mechanisms of mRNA degradation in eukaryotes. Trends Biochem, 1995, 19: 336～340

4 Driever W, Nüsslein-Volhard C. A gradient of bicoid protein in *Drosophila*. Cell, 1988, 54: 83～93

5 Edgar B F, *et al*. MPF regulation during the embryonic cell cycles of *Drosophila*. Genes Dev., 1994, 8: 440～453

6 Ferrandon D L, *et al*. Staufen protein associates with the 3′ UTR of bicoid to form particles that move in a microtubule－dependent manner. Cell, 1994, 9: 1 221～1 232

7 Fiering S, *et al*. An "in－out" strategy using gene targeting and FLP recombinase for the function dissection of complex DNA regulatory elements: Analysis of the β－globin locus control region. Proc. Natl. Acad. Sci. *USA*, 1993, 90: 8 469～8 473

8 Gagnon M L, Angerer L M, Angerer R C. Posttranscriptional regulation of ectoderm－specific gene expression in early sea urchin embryos. Development, 1992, 114: 457～467

9 Gavis E R, Lehmann R. Translational regulation of *nanos* by RNA localization. Nature, 1994, 369: 315～318

10 Guyette W A, Matusik R J, Rosen J M. Prolactin－mediated transcriptional and post－transcriptional control of casein gene expression. Cell, 1979, 17: 1 013～1 023

11 Halder G, Callaerts P, Gehring W J. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. Science, 1995, 267: 1 788～1 792

12 Lieberfarb M E, et al. Mutations that perturb poly(A)－dependent maternal mRNA activation block the initiation of development. Development, 1996, 22: 579～588

13 Lucchesi J C, Manning J E. Gene dosage and compensation in Drosophila melanogaster. Adv Genet, 1987, 24: 371～429

14 Rebagliati M R, *et al*. Identification and cloning of localized maternal RNAs from *Xenopus* eggs. Cell, 1985, 42: 769～777

15 Rosenhal E, Hunt T, Ruderman J V. Selective translation of mRNA controls the pattern of protein synthesis during early development of the surf clam, *Spisula solidissma*. Cell, 1980, 20: 487～495

16 Sallés F J, *et al*. Coordinate initiation of *Drosophila* development by regulated polyadenylation of maternal messenger RNAs. Science, 1994, 266: 1 996～1 999

17 Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3′ untranslated region of GM－CSF Mran mediates selective mRNA degradation. Cell, 1986, 91: 99～107

18 Standart N, Hunt T, Ruderman J V. Differential accumulation of ribonucleotide reductase subunits in clam oocytes: The large subunit is stored as a polypeptide the small subunit as untranlated mRNA. J. Cell Biol. Biol., 1986, 103: 2 129～2 136

第五篇

发育生物学新热点

第二十章　动物发育的环境调控

19世纪上半叶，胚胎学尚未从生物学中分离出来成为一门独立学科。在这种背景下，胚胎被看成是进化的动力，而发育则被认为受控于环境条件。例如，Weismann 于1875年就注意到：不同季节孵化的同一种蝴蝶颜色各有不同。通过降低蛹的温度，可以使夏季变体（summer morph）转变成春季变体。又例如，某些孤雌生殖的蚜虫在繁殖季节后期能形成雄体和可以产生越冬卵的有性雌体（越冬卵总是孵化为行孤雌生殖的雌体）。第一代实验胚胎学家对环境对发育的影响十分感兴趣，特别是对离子、营养对性别决定和形态发生的影响等进行了许多研究。

趋势总是在不断变化。19世纪70—80年代，年轻的动物学家逐渐对环境对发育的影响失去兴趣，转而去研究体内生理学和解剖学问题。到19世纪90年代，Roux 努力试图将实验胚胎学与生理学结合起来，他认为发育是由内部因子特别是核内因子引起的。此后，实验胚胎学便从由环境解释发育中解脱出来，而集中研究受精卵内促使胚胎发育的“力量”。这已经成为并仍将成为发育生物学研究的总体指导思想。

但是，伴随着发育和进化之间关系新热点的产生以及当今人们对生物多样性减少和环境污染物影响的重视，对发育的环境调控问题再度受到关注。一些人相信：DNA 提供控制胚胎发育的程序，即形成胚胎所需的全部信息都存在于受精卵内。然而，很多时候，环境在决定有机体表型中起关键作用。

第一节　环境对正常发育的调控

一、有机体发育利用的环境因素

某些环境因子，如1 g 的重力场和8.5 g/L 的生理盐水都能被有机体在发育过程中利用。很多卵细胞利用重力确保卵母细胞的极性；如果重力受到干扰，蛙类和鸟类的发育便会受到影响。海胆卵母细胞利用海水中的钠离子替换氢离子来激活卵细胞。哺乳动物的胚胎发育在整个胎儿期过程中和食物、氧气、离子密切相关。在上述例子中，正常发育所需的因素都不存在于卵母细胞中，而存在于发育环境之中。

（一）幼虫附着

环境因素参与正常发育在海洋生物幼虫附着过程中最为明显。这些环境因素可能不具普遍性，但却是进一步发育不可缺少的环境的一部分。浮游幼虫常常在食物丰富处或坚固的基质上附着进行变态（metamorphosis）。附着物或基质可能释放某些可溶性分子，幼虫利用这些分子作为开始附着的因子。在软体动物中常常存在许多特异性的附着因子（表20.1）。大部分裸鳃类幼虫只

表 20.1 软体动物幼虫特异性附着基质

软体动物种类	基 质
腹足纲(蜗牛、裸鳃类)	
织纹螺(*Nassarius obsoletus*)	成体栖息地的泥土
放射日规虫(*Philippia radiata*)	刺胞动物(*Porites lobata*)
Adalaria proxima	琥珀苔虫(*Electra pilosa*)
Doridella obscura	斯氏琥珀苔虫(*Electra crustulenta*)
Phestilla sibogae	刺胞动物(*Porites compressa*)
Rostanga pulchra	海绵动物(*Ophlitaspongia pennata*)
Trinchesia aurahtia	筒螅(*Tubularia indivia*)
海天牛(*Elysia chlorotica*)	成体栖息地初级微生物薄膜
Haminoea solitaria	成体栖息地初级微生物薄膜
加州海兔(*Aplysia californica*)	红藻(*Laurencia pacifica*)
杂斑海兔(*Aplysia juliana*)	石莼(*Ulva* spp.)
海兔(*Aplysia parvula*)	红藻(*Chondrococcus hornemanni*)
Stylocheilus longicauda	蓝细菌(*Lyngbya majuscula*)
Onchidoris bilamellata	活藤壶
双神经纲	
Tonicella lineata	红藻(*Lithophyllum* sp. 和 *Lithothamnion* sp.)
瓣鳃纲(双壳纲)	
船蛆(*Teredo* sp.)	木头
节铠船蛆(*Bankia gouldi*)	木头
Mercenaria mercenaria	蛤汁(clam liquor)和沙
Placopecten magellanicus	成体壳和沙等
贻贝(*Mytilus edulis*)	丝状藻和其他非生物丝状物质
弗吉尼亚巨蛎(*Crassostrea virginica*)	壳汁(shell liquor)、身体提取物和有壳生物糖原(shellfish glycogen)

有在活的成体食物激发下才发生变态。有些食物激发变态的可溶性物质已被鉴定出来。例如,船蛆(*Teredo navalis*)幼虫在木材释放的化合物诱导下附着;从牡蛎壳洗脱下来的可溶性物质可诱导牡蛎幼虫附着。

红鲍(*Haliotis rufescens*)幼虫接触到珊瑚红藻时才定居。其感受态幼虫停止游泳并开始变态所需要的只是与珊瑚红藻的短暂接触而已。虽然引起这种变化的化学物质尚未分离出来,但已知有一种藻类多肽可以诱导感受态幼虫变态。不能被诱导变态的幼虫似乎不具有该多肽受体。这种受体被认为是 G 蛋白;G 蛋白的激活对幼虫的附着和变态是必不可少的。

食物并非幼虫附着的惟一因素。例如蚋(blackfly)幼虫附着在溪流硬物表面上,被动地以流水中悬浮颗粒为食。这些幼虫主动寻找溪流高流速区,一旦进入高流速区,幼虫便不易被扁虫(flatworm)所捕食。室内研究表明:当水流速大于 35 cm/s 时,扁虫便无法捕食蚋幼虫。其原因可能是扁虫要吃掉蚋幼虫,就必须把头抬出水面;于是,其身体正面(frontal surface)暴露在水流中,从而减少了和基质的接触面积。在高流速溪流中,扁虫如要捕食蚋幼虫,将冒被溪流冲走的危险。如此一来,蚋幼虫便能存活下来,完成变态。

(二) 血餐

在许多蚊子中,产卵由吸血引发。因此,只有雌蚊叮人,并且在吸血之前雌蚊不产生卵黄蛋白原。在 *Aedes aegypei* 中,所吸血液的消化产物刺激脑细胞分泌卵子发育神经分泌激素(egg devel-

opment neurosecretory hormone, EDNH)，也称卵巢蜕皮类固醇生成激素(ovarian ecysteroidogenic hormone, OEH)。这种激素刺激卵巢产生蜕皮类固醇，促进脂肪体细胞产生卵黄蛋白原。卵黄蛋白原对于卵子形成至关重要。雌蚊不吸食血液，便不能产生卵黄蛋白原，也就没有卵细胞发育。

在吸血虫(*Rhodinus prolixus*)中，成体雌虫每吸一次血，便产生一批新卵。吸食血液有两种作用：一是血液中的蛋白为卵黄蛋白原的合成提供氨基酸；二是血液对腹部的物理性牵拉引发内分泌刺激作用，激活咽侧体(corpora allata)产生保幼激素。保幼激素促进卵巢和脂肪体内卵黄蛋白原的合成。不仅如此，一次大量吸血引起的对腹部的牵拉还能诱导幼虫蜕皮。如果吸血虫常吸血，但每次只吸少量血液，那么它能生存，但不会蜕皮和生长。显然，吸食哺乳动物血液已经成为这些昆虫发育必不可少的条件。

(三) 发育共生

一种动物的发育有时只有在另一种动物存在时才成为可能。在某些有机体中，这种关系已发展成为共生关系。有时，共生体和宿主关系如此紧密，以至于共生体不存在时，宿主便不能发育。共生体和宿主之间形成的这种关系称为发育共生(developmental symbiosis)。成体乌贼(*Euprymna scolopes*)体内有一个发光器官，由含有发光细菌(*Vibrio fischeri*)的包囊组成。相比之下，乌贼幼虫不含有发光细菌，也就没有相应结构存放细菌。但它能从泵入套腔(mantle cavity)的海水中获得发光细菌。发光细菌和套腔纤毛上皮结合，诱导纤毛上皮细胞死亡；死亡的纤毛上皮被非纤毛上皮所取代，后者再分化成存放细菌的包囊。

卵块(egg mass)和光合藻类之间的共生对于某些动物的发育也颇重要。当卵子被包裹成致密团块时，氧气的供给明显限制发育速度，因为卵块从外到内存在一个显著的氧气浓度梯度，其内部胚胎比靠近表面的胚胎发育速度相对滞后。然而，胚胎可以通过包被一薄层光合藻类解决供氧问题。例如，在黑暗条件下，两栖类和蜗牛卵块中的呼吸作用大于光合作用，但是，在有光条件下，两栖类和蜗牛可以借污着的藻类通过光合作用产生净氧，以此解决卵子对氧气的需求问题。

叶蝉(*Euscelis incisus*)的形态发生和共生菌之间存在更为密切的联系。叶蝉卵细胞质内存在着共生菌，该共生菌可以像线粒体一样，世代相传。叶蝉卵细胞质内的共生菌如此特化，以至于它只能在卵细胞质内繁殖；而叶蝉胚胎对共生菌如此依赖，以至于缺乏共生菌它便不能完成胚胎发育。据认为，共生菌对宿主胚胎消化道的形成至为关键。给宿主幼体或成体饲喂抗生素，可以从发育的卵子中除去共生菌。由这些不含共生菌的卵子发育成的胚胎缺少腹部。据认为，这种内共生体(endosymbiont)细菌能向卵细胞质中分泌一种因子。

在哺乳动物消化道内也存在发育共生现象。人从出生开始，细菌便进住肠道内，并通过400多种细菌建群(colonization)，在人肠道内不断进行生态演替(ecological succession)。在无菌条件下，小鼠肠上皮细胞不能合成某些糖基化酶mRNA。但是，如果让一株细菌在肠道内定居繁殖，便可诱导产生糖基化酶mRNA表达。

二、控制动物发育可预测的环境差异

(一) 季节与性别：蚜虫

前面已经提到，几种行孤雌生殖的蚜虫的生活方式非常有趣：孵化的卵产生的雌体能连续几代行无性生殖。不过，秋天来临时，蚜虫产出一种特殊的雌体，其卵子既能产生有性雄体又能产生有性雌体。由此得到的雌雄个体交配，所形成的卵子能够越冬。当越冬卵孵化时，产生新一代行无性

繁殖雌体。摩尔根开始研究果蝇之前，于 1909 年连续分析了几代山核桃蚜虫(hickory aphid)的染色体，发现雌性蚜虫的二倍体有 12 条染色体。在卵子发生过程中，卵母细胞只排出一个极体，因此，卵子保留 12 条染色体。这种卵不经受精便能进行孤雌发育。在所产卵子既能发育成雄性又能发育成雌性的雌性个体中，其卵子发育发生了改变。在发育成雌性的卵内，有 6 对染色体进入惟一的一个极体中，因此卵子保留二倍体的 12 条染色体；而在发育成雄性的卵内，除 6 对染色体外还有一对额外染色体也能进入极体被排掉，因此卵子保留 10 条染色体。这些雄体和雌体都是有性个体，进行完全的减数分裂，结果雌体产生含有 6 条染色体的卵母细胞；而雄体产生分别含有 6 条和 4 条染色体的两种精子。含有 4 条染色体的精子最终退化，而含有 6 条染色体的精子和含有 6 条染色体的卵子受精，重新形成二倍体(图 20.1)。受精卵冬后孵化，重新发育成雌性。

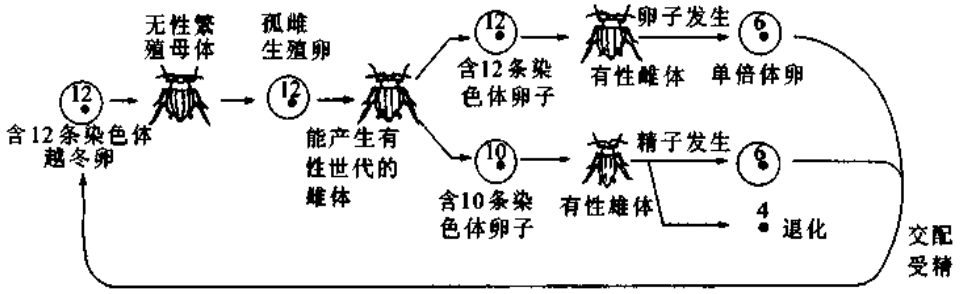


图 20.1 蚜虫染色体在生活史中的变化

秋季天气诱导产生有性雌体和雄体，两者交配产生越冬卵

这样一来，天气调控雌性个体行有性生殖还是孤雌生殖之谜便被揭开了。但蚜虫如何调控有翅或缺翅仍未解决。同样，我们也不知道是什么因素调控二倍体卵母细胞是发育成产生雄性的卵子或是产生雌性的卵子。不仅如此，环境因素在不同蚜虫种类中发挥不同的作用。图 20.2 示一种蚜虫(*Megoura viciae*)的生活史。在山核桃蚜虫和 *Megoura viciae* 中，都存在着有性世代和无性世代交替。*Megoura viciae* 中，温度决定早期发育性别，极端温度有利于产生雌体。在雌体发育过程中，光周期(白昼与黑夜的相对长度)和温度决定雌体是行有性生殖还是孤雌生殖，而温度和种群密度相结合则决定雌体是有翅个体还是无翅个体。保幼激素似乎能控制孤雌生殖和有性生殖的转换，并能抑制翅的形成。把保幼激素加到产生有性后代的成体中，可使它们产生孤雌生殖的后代。目前还不清楚环境变化是如何转变成保幼激素的作用，以及秋季的天气和阳光是如何引起染色体发生不同运动而进入极体的。

(二) 滞育

很多种昆虫的发育可以暂时停止即滞育(diapause)。滞育是进化的产物，是一种生存策略。不同种类的昆虫可以在胚胎、幼虫、蛹或成虫阶段发生滞育。有些昆虫的滞育是兼性的(faculative)，即只有在环境诱导下才能发生，而另一些种类的滞育是专性的(obligatory)，即已成为生活史的一部分。后者在温带昆虫中最为常见。温带昆虫的滞育受光周期变化诱导。如果群体中有 50% 的个体发生滞育，那么，此时的白昼长度称为临界日长(critical day length)。临界日长常常突然而至(图 20.3)。光照时间低于临界日长便进入滞育状态的昆虫称长日照昆虫。相反，另有一些昆虫只需要有几个小时光照便可正常发育，而长时间处于光照之下(大于临界日长)就会进入滞育状态，这

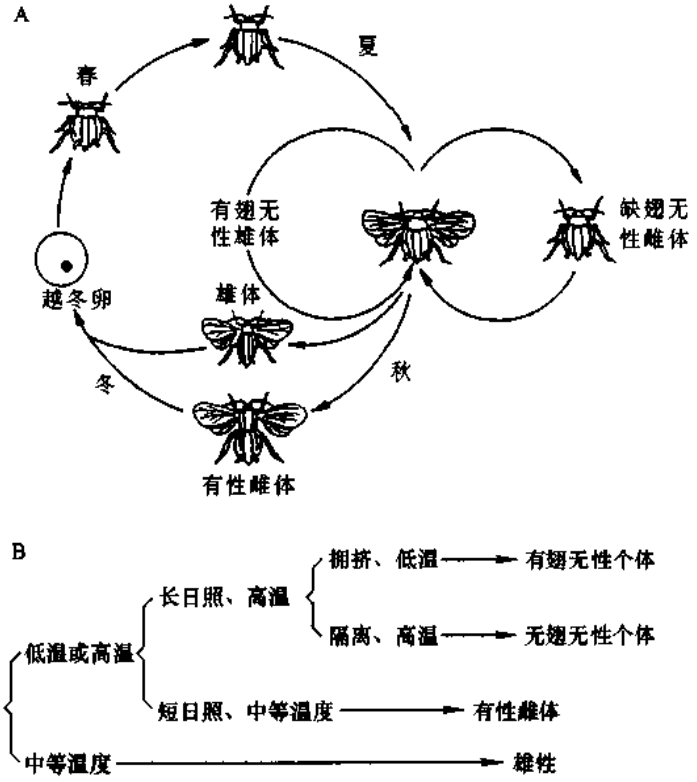


图 20.2　环境对蚜虫(*Megoura viciae*)生活史的影响

A. 有性世代和无性世代的交替。有性世代在秋季产生　B. 环境因子对发育的影响

类昆虫称为短日照昆虫。临界日长由遗传因素决定。

滞育并非是由恶劣环境条件引起的生理性反应,而是由预示环境变化的象征性刺激引起的,在恶劣环境出现之前就发生了。滞育对温带昆虫尤为重要,可以帮助它们度过严冬。蚕蛾(*Bombyx mori*)以胚胎越冬,在分节之前进入滞育状态。吉普塞蛾(*Lymantia dispar*)以充分发育的幼虫开始滞育,滞育一结束便孵化。其他昆虫则以卵、蛹甚至成体度过滞育期。

在家蚕中,胚胎滞育似乎由滞育激素(diapause hormone)调控。滞育激素是一个由 24 个氨基酸组成的多肽,由食管下神经节(subesophageal ganglion)产生。滞育激素作用于蛹期正在成熟的卵母细胞,并且随后导致胚胎发育到大约 12 000 个细胞时随即停止发育。然而,幼虫滞育似乎受促前胸腺激

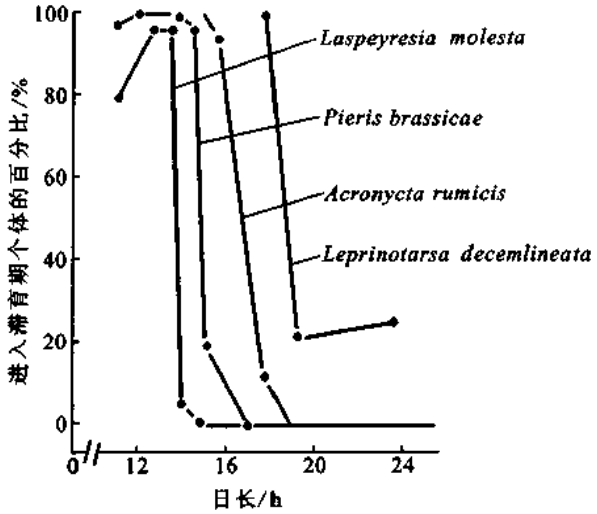


图 20.3　长日照昆虫的光周期反应

当日照时间低于一定小时数时,即诱导长日照昆虫发生滞育。图中所示 4 种昆虫,每种都在光照时间达到 14～17 小时后从滞育状态释放出来

素(prothoracicotropic hormone,PTTH)合成的抑制,抑制 PTTH 产生便能阻止幼虫蜕皮和蛹化。在许多蝴蝶中,PTTH 的抑制作用是由保幼激素持续的高效作用引起的。同样,即使发生蛹化,缺乏 PTTH 和蜕皮激素分泌也将导致滞育。滞育蛹能通过加入 20 - 羟基蜕皮激素(20 - hydroxyecdysone)重新被激活发育。但是,正常条件下,把滞育蛹(如 *Hyalophora* 的蛹)置于较冷的天气中一段时间,其脑部能被激活发育,而处于温暖环境中的蛾蛹仍保持滞育状态,直到死去。迄今尚不清楚通过温度和日照长度变化调节激素产生的机制。

三、表型可塑性:非遗传多型性和反应规范

个体在一种环境中表达一种表型,而在另一种环境中则表达另一种表型的能力称为表型可塑性(phenotypic plasticity)。有两种表型可塑性:非遗传多型性(polyphenism)和反应规范(reaction norm)。非遗传多型性是指由环境导致的非连续表型。例如,迁移性蝗虫以互不相同的两种形态存在:短翅、颜色均匀的散居型蝗虫和长翅、体色明亮的群居型蝗虫,其幼虫究竟发育成哪一种形态由环境(主要是种群密度)决定。同样,光蝉(planthopper)若虫(nymph)依据不同环境能向两个方向发育:高种群密度和一定植物群落导致产生迁移性昆虫,其第三胸节形成一大的后翅;而低种群密度和其他食用植物导致产生不会飞的光蝉,其第三胸节发育成类似平衡棒的退化翅。北极动物毛皮颜色的季节性变化是非遗传多型性的又一例证。

有时候,基因组编码一组潜在表型,而由环境选择适应性最强的表型。例如,持续高强度的劳作可使肌肉长得更粗大,但肌肉变粗大的限度由遗传决定。与之类似的是,蝾螈幼体的小生境(microhabitat)可引起其体色发生变化,但仍然在遗传限定的范围内。这种在一定环境条件范围内由一个基因型所表达的一系列连续表型称为反应规范。因此,反应规范是基因组的一个属性,是可以选择的。不同基因型能够表达的可塑性的方向和程度各不相同。反应规范能够遗传的限度构成了表型可塑性进化的基础。

(一) 季节性非遗传多型性

非遗传多型性明显存在于 *Nemoria arizonaria* 中。这种蛾具有一种相当典型的生活周期:卵在春季孵化,毛虫以小栎树花(oak flower)为食,于晚春变态,夏季交配,然后在栎树上产出另一批毛虫;这些毛虫吃栎树叶,再经变态、交配和产卵;所产卵子越冬后,于次年春季进入下一个生活周期。值得一提的是,春季孵化的毛虫看起来与它们在夏季孵化的后代毫无相似之处:春季孵化、以栎树花为食的毛虫呈黄褐色、具皱纹和念珠,状似栎树花,伪装得很巧妙以避免被捕食;而夏季孵化的毛虫则伪装成栎树枝条(此时栎树花已不存在)以避免被捕食。这些变化是由什么调控的呢?Greene(1989)通过交互饲喂实验证明:给春季变体饲喂栎树叶能使之转变成夏季变体,不能通过饲喂栎树花使夏季变体转变成栎树花样毛虫。因此,栎树花样毛虫是一种未受诱导状态(default state),能被某种物质诱导产生栎树枝条样形态。这种物质可能是栎树叶中的鞣酸(tannin)。

季节性非遗传多型性也出现于欧洲地图蝶(*Araschnia levana*)中。欧洲地图蝶有两种季节性表型,差别非常大,林奈曾将它们划为两个不同的种。春季变体全身呈带黑点的亮橙色,而夏季变体全身呈带白条的黑色。由春季变体向夏季变体的转化既受幼虫期日照时间的控制,又受温度的控制。据认为,日照时间和温度能控制蜕皮激素释放时间,启动最后的变态蜕皮。在化蛹 3 天内,给滞育蛹注射 20 - 羟基蜕皮激素能重新启动发育,形成夏季变体;如果化蛹 10 天后才注射 20 - 羟基蜕皮激素,则产生春季变体。

在整个北半球，人们都能够在夏季长日照时孵化和秋季短日照时孵化的蝴蝶 *Colias* 和 *Pieris* 中看到非遗传多型性现象。*Colias* 和 *Pieris* 中都存在非遗传多型性现象。短日照时孵化的蝴蝶的后翅色素比长日照时孵化的蝴蝶后翅深，这在秋季天气较凉的月份里具有功能上的优势。深色蝴蝶在飞行中可以利用较深的色素提升身体的温度，因为较深的色素能更有效地吸收太阳能辐射，使体温比浅色的蝴蝶上升快。

热带地区常常存在潮湿季节和干旱季节交替的现象。在非洲，马拉维蝴蝶（*Bicyclus anynana*）存在适应季节变化的非遗传多型性现象。寒冷干燥季节的变体是隐藏性的，看上去像是栖息地的褐色枯叶；酷热潮湿季节的变体较活跃，腹部后翅具眼点，可以转移来自鸟类或蜥蜴的攻击。据认为，变态的决定因素是化蛹期间的温度。低温时产生干旱季节变体；而高温时产生潮湿季节变体。

（二）营养性非遗传多型性

并非所有的遗传多型性现象都由季节控制。在蜜蜂中，雌性幼虫蜕皮时蛹的大小决定它是发育为工蜂还是发育为蜂王。用营养丰富的蜂王浆喂养的幼虫在最后龄期（instar stage）内仍保持着咽侧体的活动。咽侧体分泌的保幼激素使化蛹推迟，最终使雌蜂身体变大成王，甚至在某些种类中使其解剖结构发生特化。预定成为蜂王的幼虫，其体内保幼激素水平是预定成为工蜂的幼虫的 25 倍；工蜂幼虫经保幼激素处理后也能变成蜂王。

与此相似，蚁群主要有两类：工蚁和雌蚁（gyne）。雌蚁即潜在的蚁后。在更特化的蚁群中，还可见到身体较大的兵蚁。在 *Pheidole bicarnata* 中，这种等级制度是由正在发育的幼虫体内的保幼激素水平决定的。用含丰富蛋白的食物喂养幼虫，其保幼激素效价提高，结果导致开始变态时幼虫体积发生变化，出现身体大小不同的明显的不连续差异，由此导致产生兵蚁和工蚁两个等级。兵蚁头和颌的生长速度快于身体其他部分。这种发育程序的重新编排也可能包含有基因活性的变化，因为工蚁和兵蚁的角蛋白是不同的。

在不同的种类中，社会等级可以由环境决定，也可以由激素决定，还可由两者共同决定。在大多数蚂蚁种类中，幼虫直到接近化蛹时仍具有两种发育潜能。在 *Myrmica rubra* 中，越冬幼虫保持两种发育潜能。冬季过后，蚁后刺激工蚁对最后龄期幼虫少喂食物，这意味着只要蚁后存在，就不会产生新蚁后。如果给幼虫喂足够的食物，它们就能发育成雌蚁。在另一些种类中，如 *Pheidole pallidula*，蚁后通过在胚胎发生中发生作用的化学物质控制雌蚁形成，结果也不会形成新蚁后。

（三）环境依赖型性别决定

许多动物是由环境决定是发育为雌性还是雄性的。某些鱼类和爬行动物的温度依赖型性别决定是最好的例证。图 20.4 示爬行动物中温度依赖型性别决定的主要方式。这种由环境决定性别的方式既有优点也有缺点。其优点之一是，动物不受 1∶1 性别决定比例的束缚，有利于有性繁殖。在鳄鱼中，极端温度产生雌鳄鱼，而温和温度产生雄鳄鱼，雌雄比例可高达 10（雌）∶1（雄）。温度依赖型性别决定的主要缺点在于它使动物只能在很窄的温度范围内生存，这意味着热力污染（thermal pollution）（局部性或是全球性的变暖）极有可能使某一物种在某一地区消失。Ferguson 和 Johnsen（1982）就曾推测：恐龙的性别决定方式可能是温度依赖型的；它们的灭绝很可能是由于环境温度的轻微变化导致卵中孵化出的恐龙只有单一的雄性或雌性引起的。

环境决定性别是对不均衡生境的一种适应。不均衡生境在某个区域可能对雄性个体有利，而在另一个区域则对雌性个体有利。Conover 和 Heins（1987）发现：某些鱼类雌性个体大对其有好处，因为体大者生殖力（fecundity）大，产生后代多。对雌性 *Menidia* 来说，在繁殖季节早期出生是

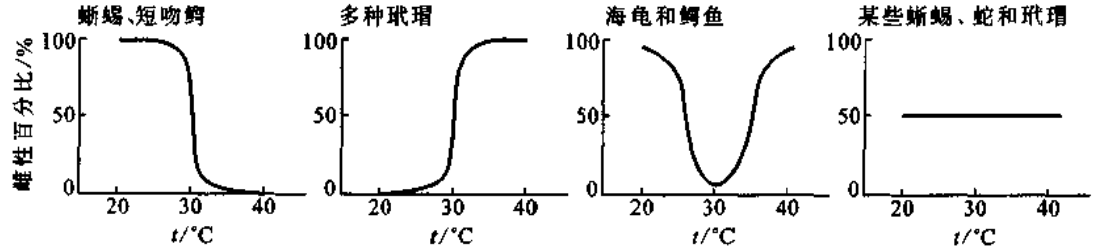


图 20.4 温度依赖型性别决定模型

前三个图中，不同的温度可以决定雌性或雄性，而在最后一个图中，温度在性别决定中不起作用

有利的，因为仔鱼摄食季节更长，长得更大；而对雄性 *Menidia* 来说，身体大小并不重要，出生早晚也就无多大关系。Conover 和 Heins 还发现：在 *Menidia* 南方分布区，雌鱼确实是在繁殖季节早期出生；对此，温度可能起主要作用。相比之下，在 *Menidia* 北方分布区，则不存在环境决定 *Menidia* 性别的现象。北方分布区的 *Menidia* 在各种温度下都产生雌雄 1∶1 的性别比例。Conover 和 Heins 推测，*Menidia* 北方种群摄食季节很短，雌鱼早出生并无优势。因此，这种鱼在适应的南方水域由环境决定性别，而在不适应的北方水域则由基因型决定性别。从上例中可以清楚看出，环境可以诱导性别表型，性别表型是基因组的一个属性。

四、控制动物发育不可预知的环境因子

多数对适应性的研究都与成体结构使有机体在危险或敌对的环境中生存下去所发挥的作用有关。然而，胚胎也必须在同样栖息地生存，甚至要在成体适应之前生存下去。如前所述，幼虫的保护色就是一个例子。类似的例子还有幼虫向其天敌注射毒物。副王蛱蝶(viceroy butterfly)和黑脉金斑蝶(monarch butterfly)的毛虫分别是上述两种幼虫生存策略的典型代表。在鱼类中，温度并非是影响性别决定的惟一环境因子。巴拿马鱼蓝隆头鱼(blue-headed wrasse)的性别决定取决于其所遇到的种群。如果蓝隆头鱼胚胎到达一处礁石，那里有一尾雄鱼和许多尾雌鱼共同生活，那么它将长成一尾雌鱼。当惟一的雄鱼死亡之后，通常个体最大的雌鱼转变成雄鱼：在一天之内，其卵巢萎缩，精巢开始生长。如果蓝隆头鱼胚胎到达一处礁石，那里没有雄鱼或者未被雄鱼所占据，那么，它就能发育成一尾雄性蓝隆头鱼。

(一) 抗拒捕食的诱导防御

有些胚胎可通过分泌到卵内或卵子周围的物质保护自己在不利环境条件下生存下来；还有些胚胎受环境诱导避开正常发育途径，而形成特定的发育途径来保护自己。在 *Nemoria* 毛虫中，食物可以改变其表型，从而保护它免于被捕食。一些动物将这种策略进一步完善，其幼虫发育可随天敌释放的化学物质改变，从而使幼虫更好地躲避捕食者。这种现象有时被称为天敌诱导防御(predator-induced defense)或天敌诱导非遗传多型性(predator-induced polyphenism)。

要验证天敌诱导防御，就必须证明天敌(通常是天敌释放的可溶性化学物质)能诱导表型变化以及表型改变可以在天敌出现时增加表型承载者的适合度(fitness)。例如，水蚤(*Daphnia*)和轮虫在池塘内有天敌生长时，发育时就会改变形态(图 20.5)。天敌晶囊轮虫(*Asplanchna*)向水中释放一种可溶性化合物，诱导其猎物龟甲轮虫(*Keratella slacki*)卵发育成身体略大的个体，其前端刺针(anterior spine)比正常情况下的长 130%。这种变化使天敌难以吃掉它们。荔枝螺(*Thais lamel-*

losa)在天敌螃蟹流出物的影响下,形成加厚的壳,并在壳口处形成一齿状结构。在混合群体内,在50%正常荔枝螺被吞食之前,螃蟹不会攻击厚壳荔枝螺。

天敌诱导非遗传多型性并不仅局限于无脊椎动物。灰色树蛙(*Hyla chrysoscelis*)在天敌存在时,其幼体尾鳍长得更大,并变成亮红色。这使蝌蚪能很快地游离险区,并使天敌的攻击偏向尾部。鲤鱼(*Carassius carassius*)在其天敌梭鱼(pike)吞食过同伴之后,也发生反应对抗天敌,即形成大肚子弓背变体,使梭鱼的嘴巴吞不下它。在多数天敌诱导的防御反应中,有得也有失。就鲤鱼而言,大肚弓背体形使梭鱼无法吞食,但肥大的鱼体对游泳形成一种阻力,使游泳速度减慢。图20.5示几种动物正常的形态和天敌诱导的形态。在每个例子中,来自天敌周围水中的可溶性过滤物都能诱导非遗传多型性变化。如图20.5所示,诱导变体在避免被捕食方面是非常成功的。

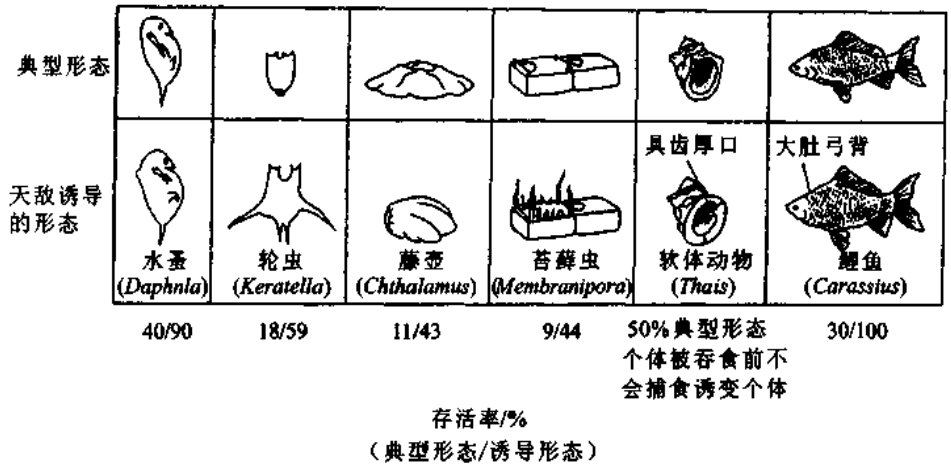


图20.5　天敌诱导非遗传多型性

示各种生物典型的形态和天敌诱导的的形态。每一列下面的数值表示诱导的个体和非诱导的个体在面临天敌时各自能幸免于难的百分数

(二)表型可塑性和环境变化

锄足蟾(*Scaphiopus couchii*)有一非同寻常的生活史。这种蟾蜍通常在与Sonoran沙漠第一场春雨相伴的第一声春雷中从冬眠中惊醒。锄足蟾在雨水形成的临时性池塘中繁殖,胚胎迅速发育成幼体。幼体变态之后,新生的蟾蜍又回到沙漠,钻入沙内冬眠,直到次年春天第一场暴雨将它们重新唤醒。

沙漠池塘的存在可能是短暂的,会很快干涸。根据起初池塘水深和降雨频率不同,沙漠池塘存留时间长短不一。可以想象锄足蟾胚胎面对的选择只有两种可能:一是池塘水保持到幼体完成变态时不干涸,蟾蜍存活下来;一是池塘水在它变态完成前干涸,蟾蜍死去。实际上,锄足蟾(还有其他多种两栖类)进化出第三种选择,即变态时间由池塘控制。如果池塘不干涸,发育继续以正常速度进行,蝌蚪以藻为食,最终发育为幼蟾;如果池塘不断干涸,蝌蚪变得越来越拥挤,那么,其中一些蝌蚪便开启替代性发育途径:形成一宽阔的嘴巴以及强有力的颌肌,不但吞食藻类,而且吞食其他锄足蟾蝌蚪。这些肉食性蝌蚪发育速度加快,很快完成变态,只是幼蟾身体较小而已。当其他锄足蟾蝌蚪或因干燥或因被其同伴吞食而死去之际,肉食性蝌蚪却活了下来(图20.6)。

棘皮动物幼虫中也存在表型可塑性。食物缺乏时，长腕幼虫纤毛腕变长，增加幼虫摄取食物的能力。但是，长腕幼虫纤毛腕的增长是以成体器官原基在幼虫期内生长为代价的。纤毛腕增长后的长腕幼虫需要花更长的时间完成变态。

表型可塑性赋予有机体对不同环境条件发生反应的能力。不同的表型适合于不同的环境。快速发育型锄足蟾蜊蚪适应于在快速干涸的池塘内生存；而缓慢发育型锄足蟾蜊蚪适合于在非干旱条件下生存，将来发育成为体大而壮的蟾蜍。对表型可塑性而言，有得必有失，但它确实能保证在不利条件下总有一些动物会幸免于难存活下来，使物种得以延续。

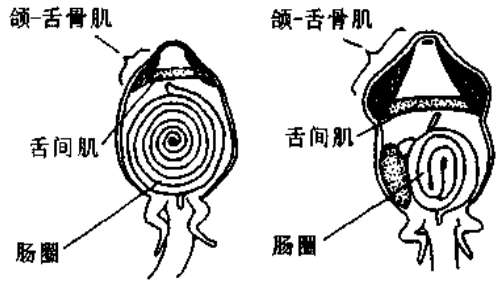


图 20.6 锄足蟾蜊蚪的非遗传多型性

正常变体是杂食性的，通常以昆虫和藻类为食。池塘干涸时，形成肉食性变体，具有宽阔的口和强大的咀嚼肌，消化道也出现肉食性特征

五、发育的连续可塑性

有机体感知环境变化并作出相应反应的能力对其在复杂环境下生存至关重要。人类的两个主要感觉系统即神经系统和免疫系统使人类能调节身体发育，对环境刺激发生反应。

（一）成人免疫系统的发育

如果说天敌诱导非遗传多型性是对潜在威胁的适应性反应，那么，哺乳动物的免疫系统则在这方面达到了登峰造极的地步。哺乳动物的免疫系统具有一套精细的机制，去感知和破坏进入体内的异源物质。当身体接触到外来分子（称为抗原）时，免疫系统便制造抗体并分泌到血液中。抗体与抗原结合，灭活或清除抗原。Burnett（1959）提出的克隆选择假说（clonal selection hypothesis）阐明了免疫应答的基础。克隆选择假说包括以下 5 个要点：

（1）每个 B 淋巴细胞（B 细胞）都能且只能产生一种抗体，也就是说，一个 B 细胞能产生一种与脊髓灰质炎病毒结合的抗体，而相邻的另一 B 细胞能产生与白喉毒素结合的抗体。

（2）每个 B 细胞都携带自己所产生的抗体，并将它置于细胞膜上，特异性位点向外。

（3）抗原被递呈给 B 细胞（通常发生在巨噬细胞的表面）。

（4）只有和抗原结合的 B 细胞能够发育成为分泌抗体的浆细胞（plasma cell）。B 细胞反复分裂，形成具有大量糙面内质网的细胞，合成大量的抗体分子。抗体分子被分泌到血液中。

（5）抗体的特异性与 B 细胞表面抗体分子的特异性完全一样。

B 细胞表面的抗体类型是随机决定的。B 细胞能合成的抗体类型达 1 000 万之多，但每个 B 细胞只能产生一种类型的抗体。B 细胞不断产生又不断被破坏掉。然而，当抗原结合到某一组 B 细胞上时，这些 B 细胞受到刺激而发生分裂（图 20.7），并分化为浆细胞（分泌抗体）和记忆细胞（memory cell）（移居淋巴结中，以后当再次接触到同种抗原时迅速发生反应）。因此，每个人的浆细胞和记忆细胞群根据接触到的抗原不同而各不相同，即使同卵双胞胎也不例外。

（二）学习：环境适应性神经系统

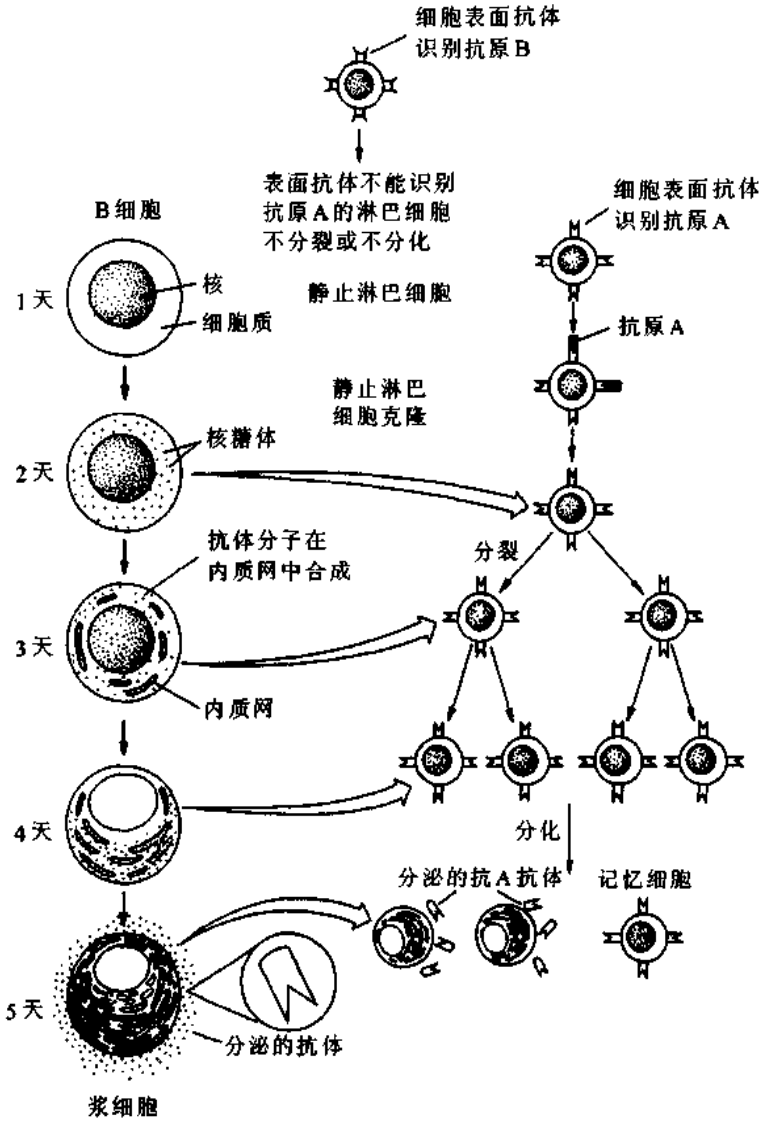


图 20.7　抗体形成克隆选择模型

每个 B 细胞产生一种特定类型的抗体蛋白(免疫球蛋白),并在它的细胞膜表面展现出来。当抗原(异体物质)与 B 细胞膜上抗体结合后,B 细胞分裂、并分化出能分泌抗体的浆细胞。浆细胞只产生原来 B 细胞所能产生的特定类型抗体

活动是决定成年有机体保留哪种神经元突触的关键因素。新的经历能改变一组原有神经元的联系,形成新神经元或在现有神经元之间形成新突触。神经元一旦形成,便不再分裂,因此,一个新神经元的"诞生"可用放射性胸腺嘧啶脱氧核苷处理有机体来确定。正常情况下,不会有放射性胸腺嘧啶脱氧核苷掺入到已经形成的神经元 DNA 中。但是,在处理过程中,如果由细胞分裂产生一个新神经元,那么,放射性胸腺嘧啶脱氧核苷就会掺入到新的神经元 DNA 中。在雄性鸣禽学习鸣唱时就可以看到这样新形成的神经元。斑胸草雀(zebra finch)幼雀能记住一首歌,并能学会唱特定乐句所必需的肌肉收缩方法。在这个学习和重复过程中,斑胸草雀在大脑新纹状体(hyperstriatum)上形成新神经元;许多这些新神经元向控制发声肌肉的原纹状体(archistriatum)上发出轴突。相比之下,在不能鸣唱的老年雄鸟或者不会学唱的雌性幼鸟中,都见不到上述变化。

在刺激性环境中饲养的大鼠大脑皮层的神经元、突触和树突比在非刺激性环境中饲养的大鼠要多。即使是成年大鼠的脑，也能根据新的经历而发育。成年金丝雀(canary)学唱新歌时，形成新的神经元，其轴突从大脑的一个发声区伸向另一个区域。与此类似，成年大鼠在木钉上学习保持身体平衡时，其小脑的浦肯野细胞(Purkinje's neuron)产生新的突触。因此，神经系统在成年后仍能继续发育，神经元联系的型式是遗传的模式形成(inherited patterning)和由经历产生的模式形成两者共同构成。这种先天发育和后天发育之间的相互影响也存在于哺乳动物视觉系统中。

(三) 哺乳动物固有视觉通路的后天变化

哺乳动物视网膜到大脑的传导通路如图 20.8 所示。由视网膜神经节细胞发出的轴突形成两条视神经，在视神经交叉(optical chiasm)处相遇。如同在非洲爪蟾的蝌蚪中一样，一些神经纤维进入大脑对侧皮层；但与其他大多数脊椎动物不同的是，哺乳动物视网膜细胞还发出神经纤维至大脑同侧皮层。这些神经纤维终止于两个外侧膝状核(lateral geniculate nucleus)上。来自每只眼睛的传入神经纤维保持分离：外侧膝状核前端最上层接受来自对侧眼的轴突，而外侧膝状体核中间部分接受来自同侧眼的轴突。当来自外侧膝状核的神经元与视皮层的神经元联系起来后，情况就更加复杂了。大脑皮层中有 80% 以上的视皮层细胞接受来自双眼的传入神经纤维，其结果是产生双眼视觉和深度感知。另一有趣的发现是，视皮层投射在两只眼睛中没有区别。如果一个皮层神经元受到来自左眼向上 5°、中央凹(fovea)向左 1°交叉区域的闪光刺激，它也会受到来自右眼向上 5°、中央凹向左 1°交叉区域的闪光刺激。双眼受到刺激在皮层细胞中引起的反应要比单独受到刺激时的反应要强。

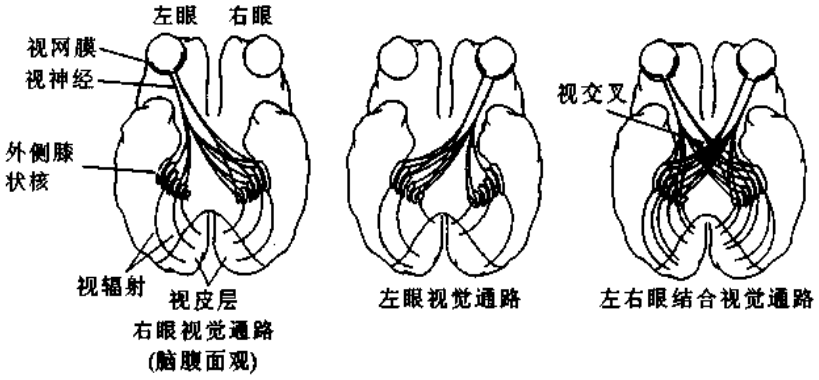


图 20.8 哺乳动物视觉系统主要通路

在哺乳动物中，来自每只眼睛的视神经都分叉，向大脑两侧膝状核发出神经纤维。在同侧，视网膜特定部位的神经纤维进入外侧膝状核的特定部位，而在对侧，外侧膝状核接受视网膜所有部位的传入纤维。每一侧的外侧膝状核神经元都与同侧的视皮层联系

Hubel 等(1967)证明：神经系统的发育在一定程度上取决于个人在关键发育过程中的经历。换句话说，并非所有神经元的发育都编码于基因组中，有一些神经元是通过学习获得的。经历可以强化或固定出生时业已存在的神经元联系，而削弱或消除其他神经元联系。部分感觉损伤(sensory deprivation)充分说明了这一点。如果把刚出生小猫的右眼睑缝合，3 个月后拆除缝合线，那么，小猫的视皮层细胞不能被进入右眼的光线所刺激，几乎所有进入视皮层的传入神经纤维都来自左眼。小猫的行为也表明其右眼有缺陷：只要把小猫左眼遮盖起来，它便成了瞎子。由于小猫外侧膝状核

神经元既能被进入左眼的光线刺激，又能被进入右眼的光线刺激，因此，生理上的缺陷可能存在于外侧膝状核和视皮层之间。猕猴中也观察到类似的现象。据认为，猕猴有关的生理缺陷和受被蒙眼睛神经支配的外侧膝状核神经元不能合成蛋白质有关。

如果把缺乏视觉归结为没有形成适当的视觉连接，这的确是一个诱人的结论。但是，实际情况并非如此。小猫出生时，接受双眼投射的外侧膝状核神经元的轴突和视皮层广泛区域重叠。如果在小猫很小的时候蒙住它的一只眼睛，那么被蒙眼睛与视皮层的连接就被另一只眼睛的连接所取代。于是，竞争发生了，且经历在强化和固定每个外侧膝状核至视皮层的联系方面起很大作用。因此，如果把小猫双眼缝合 3 个月，大部分视皮层细胞仍然能被来自一只眼或另一只眼的光亮所刺激。在小猫发育过程中，神经元建立有效联系的关键时期在受精后第 4 周和第 6 周之间。在第 4 周之前，单眼损伤(monocular deprivation)很少导致生理缺陷；但在第 6 周之后，单眼损伤就会导致所有特征性的神经元改变。如果小猫在出生后前 3 个月内有正常的视觉经历，那么，随后进行的任何单眼损伤都不会引起视觉缺陷，因为突触已经固定下来。

从哺乳动物视觉系统图式形成可以得出两条规律：第一，视觉涉及到的神经元联系在动物能视物之前便已存在；第二，经历在决定神经元联系是否保留中发挥重要作用。正如经历能进一步完善原有神经－肌肉联系一样，经历同样在改善和完善视觉联系方面也起作用。学习和记忆这类成人的功能很可能产生于由经历而建立或强化的不同突触。可见，动物和生存环境之间的相互作用在其整个生命过程中连续不断地塑造着神经系统；神经系统的塑造并不按编排好的方式进行。因此，经历对神经系统的修饰是最后也是最微妙的发育策略。

第二节　环境对正常发育的扰乱破坏作用

一、畸形和干扰作用

从本章第一节可知，发育指令并非全部存在于基因中，甚至也不全存在于合子中。生物体对环境作用很敏感，这就使生物体容易受环境变化的影响，发育也容易受到干扰。

如果说我们每个人都能活着诞生，这真是奇迹，那么你是对的。据估计，人类大约有二分之一到三分之二的胚胎不能发育至分娩。很多胚胎过早出现异常，根本不会在子宫内着床；另一些胚胎虽然着床，但不能建立妊娠。因此，大多数异常的胚胎在妇女知道自己怀孕之前便自行流产了。Edmonds 等(1982)利用一种灵敏的免疫学检测手段，能检测出人类受精后 8 天或 9 天绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin，hCG)的存在。他们共检查出 112 个显 hCG 阳性的正常妇女，其中有 67 个妊娠未能保留下来。

由此可见，人类许多胚胎在发育早期便夭折了。不过，肺、肢体、面部或口腔等部位的缺陷对胎儿并无大碍(胎儿在母体内不依赖这些器官生存)，但会严重地威胁出生后婴儿的生命。因此，人类大约有 5% 的新生儿畸形，其中有一些并不严重，而另一些则很严重。

先天异常、胎儿死亡及早产儿都可以由体内和体外两种因素引起。由遗传事件(突变、非整倍性、易位)引起的异常称畸形(malformation)。例如，无虹膜(aniridia)是由 *PAX6* 基因突变引起的畸形，而唐氏先天愚症(Down's syndrome)是由三倍性 21 号染色体导致的畸形。多数胚胎和胎儿

死亡很可能是由能影响正常发育过程的染色体异常所致。由外源因素(化学物质、病毒、放射性或高温)引起的异常称为干扰作用(disruption)。引起干扰作用的因子称为致畸因子(teratogen)。研究环境因子如何干扰正常发育的学科称为畸形学(teratology)。致畸因子常在某一关键发育时期发挥作用。对每个器官发生来说,其最关键时期是生长和结构形成阶段。尽管受精后 15～60 天是人类许多器官形成的关键时期,但是,不同器官的关键发育时期各不相同。心脏主要在第 3～4 周之间形成,其间心脏对环境因子最敏感;外生殖器则在第 8～9 周对环境因子最敏感;而大脑和骨骼从第 3 周直至妊娠结束乃至出生后一直对环境因子敏感。

二、致畸因子

动物不同,致畸因子也不相同。表 20.2 列出了部分人类致畸因子。

表 20.2 对人类胎儿发育有破坏作用的部分致畸因子

药物和化学试剂
酒精;氨基糖苷(aminoglycosides);氨基喋呤(amenopterin);抗甲状腺试剂(PTU);溴;香烟烟雾;可卡因;可的松;二乙基己烯雌酚(diethlstibesterol, DES);二苯基乙内酰脲(diphenylhydantoin);海洛因;铅;甲基汞;青霉胺;维生素 A 酸(retinoic acid);链霉素;四环素;酞咪哌啶酮(抗妊娠反应药)(thalidomine);三甲双酮(抗惊厥药)(trimethadione);丙戊酮(valproic acid);华法令(warfarin)
电离辐射(X－射线)
高温
感染性微生物
柯萨奇病毒(cosackie virus);巨细胞病毒(*Cytomegalovirus*);单纯疱疹病毒;细小病毒(*Parvovirus*);风疹病毒;弓形体(*Toxoplasma gondii*);梅毒密螺旋体(*Treponema pallidum*)。
母体代谢状况
自身免疫疾病(包括 Rh 不相容性);糖尿病;膳食缺乏和营养不良;苯丙酮尿症

致畸因子的主要种类包括药物和环境中的化学物质。环境中天然存在的某些化学物质可以导致先天畸形(congenital malformation)。在高山原始草地上生长着一种臭菘(*Veratrum californicum*),有时绵羊会吃这种臭菘。如果怀孕的母羊吃过这种植物,就会给胚胎的神经发育造成严重损伤,如独眼畸形(cyclopia),即两只眼睛在面部中央并合在一起。这种情况在人类、猪和其他许多种哺乳动物中也会发生,受影响的有机体于出生后不久即死亡,原因是严重的脑缺陷,包括脑垂体缺失。

奎宁(quinine)和酒精是两种植物衍生物,也能导致先天畸形。奎宁能导致耳聋;而酒精能导致婴儿生理和心理障碍。尼古丁和咖啡因虽然还未被证实可以导致先天异常,但吸烟过度的妇女(每天 20 支香烟或更多)所生的婴幼儿可能比不吸烟的妇女所生的婴幼儿小。对于男性来说,每天只需吸 4 支烟,就会使其精子的数量活动能力显著降低。

另外,我们所生活的这个工业化社会每年都生产数百种广泛使用的新化合物。杀虫剂和有机汞化合物都是人工合成的化合物。如果母亲在怀孕期间摄取了杀虫剂或有机汞化合物,就会导致胎儿神经和行为异常。发生在 1965 年的一场悲剧充分说明了这一点。当时,一家日本公司往湖里倾倒水银,水银被湖里的鱼吞吃,鱼又被水俣(Minamata)村的孕妇所食用,结果导致胎儿大脑损伤和盲眼,即所谓的水俣病(Minamata disease)。

（一）视黄酸（维生素A酸）

有时候，身体正常发育所需的化合物在特定时间大剂量服用也会产生有害效果。视黄酸（retinoic acid）在哺乳动物胚胎前后体轴和肢体形成时起重要作用。在哺乳动物胚胎前后体轴和肢体形成时，视黄酸由互不相连的细胞所合成，而且仅局限于一个很小区域内发生作用。如果向母体提供大量视黄酸，那么，正常情况不可能接触到如此高浓度视黄酸的细胞就会作出反应。我们知道：在体内，维生素A和13－顺－视黄酸（13－*cis*－retinoic acid）异构化形成具有发育活性的全反式视黄酸（all－*trans*－retinoic acid）和9－顺－视黄酸（9－*cis*－retinoic acid）。视黄酸不能直接与基因结合。要影响基因调控，视黄酸必须结合到被称为视黄酸受体（retinoic acid receptors，RARs）的一组转录因子上。RARs蛋白总体结构与类固醇类激素以及甲状腺激素受体结构相同；RARs蛋白只有和视黄酸结合之后才具有活性。视黄酸受体和DNA中被称为视黄酸反应要素（response element）的特异性增强子结合。视黄酸反应要素含有至少2个拷贝的GGTCA序列。有些*Hox*基因启动子就包含视黄酸反应要素。视黄酸受体有三种，RAR－α、RAR－β和RAR－γ。每种受体都能和两种形式的视黄酸结合，并且都与相同的视黄酸反应要素结合。

视黄酸已经被用于治疗严重的囊性痤疮（粉刺）。自1982年以来，这种药物（商品名为accutane）已经商品化。从20世纪50年代起，人们就知道，给各种妊娠动物饲喂大剂量的维生素A或其类似物，将对胎儿产生有害作用。因此，药物accutane都带有警示标明：孕妇禁用。然而，自accutane诞生以来，大约已有160 000名育龄妇女（15～45岁）使用过这种药物，其中一些人是在孕期使用的。有人研究过一组使用视黄酸的孕妇，发现在59例胎儿中，有26例没有任何异常，12例自然流产，21例明显畸形。畸形胎儿的典型特征是：缺少耳朵或耳朵有缺陷，缺少下巴或下巴较小，腭裂、主动脉弓异常，胸腺有缺陷以及中枢神经系统异常。

这种先天异常的特征与孕期内饲喂过视黄酸的大鼠和小鼠所产生的畸形胚胎相似。将8天大的小鼠胚胎放到极低浓度的13－顺－视黄酸溶液（2×10^{-6}mol/L）中，结果大约三分之一的胚胎发育出典型的异常特征，包括第1和第2对咽弓体积显著变小。正常小鼠中，第1对咽弓最终形成颌部上颌骨和下颌骨以及中耳的两块听小骨，而第2对咽弓形成中耳第3对听小骨及其他面部骨骼。

这种发育干扰作用的基础可能在于视黄酸能改变*Hox*基因表达，使前后体轴的某些部分重新发生特化，并抑制神经嵴细胞从神经管颅区迁移。现已证明，放射性标记的视黄酸能与颅区神经嵴细胞结合，并抑制其分化与迁移。视黄酸和神经嵴细胞的结合似乎对颅区神经嵴衍生的细胞具有特异性，且视黄酸的致畸效应局限于特定的发育阶段（小鼠8～10天胚胎；人20～35天胚胎）。

（二）酞咪哌啶酮（应停）

1961年之前，几乎不存在任何药物诱导人胚畸形的证据。但就在1961年，Lenz和McBride各自独立积累的一些证据表明，一种温和性镇定剂（sedative）——应停可以导致一种以前罕见的先天性异常综合征的明显增加。最明显的异常是海豹肢畸形（phocomelia），即肢体长骨缺失（amelia）或严重短缺（peromelia），从而导致四肢状似海豹附肢。大约已有7 000名婴儿因为母亲服用应停而受到影响。应停致畸作用特别强，母亲只要服用一粒应停，便会导致婴儿所有四肢异常。服用应停而导致的其他畸形包括心脏缺陷、外耳缺失和消化道畸形。由于具有很强的致畸作用，应停已于1961年11月被禁止销售。

Nowack（1965）研究了应停致畸易感期（susceptibility），发现这种药物在上一次月经后34～50天期间（怀孕20～36天）具有致畸性。应停作用的特异性见图20.9。上一次月经后34～38天，服用应停不会导致婴儿肢体异常，但将导致婴儿耳朵缺失或缺陷。应停导致上肢畸形的时间比导致下肢畸形的时间出现得早，这是因为发育过程中，上肢的发育早于下肢的发育。

由应停导致的悲剧表明了用动物模型检验药物潜在致畸作用的局限性。不同的动物（甚至种内不同品系）对应停的代谢作用都存在着差异。人们通常用小鼠或大鼠来检验药物致畸作用。妊娠小鼠和大鼠服用应停不会导致婴儿畸形。母兔服用应停会产生畸形的后代，但其缺陷与人类胎儿中发现的缺陷不同。灵长类如绒猴（marmoset）对应停的易感期与人类类似。因此，由应停诱导的畸形绒猴胎儿已被用来揭示应停的致畸机理。有人认为应停可能影响神经嵴衍生的细胞分化。也有人推测背神经节中的神经元是维持肢体发育所必需的，而应停正是通过干扰或破坏这些神经元发挥致畸作用。还有人认为应停初始靶位是肢芽及其毛细管上的粘连分子。给绒猴饲

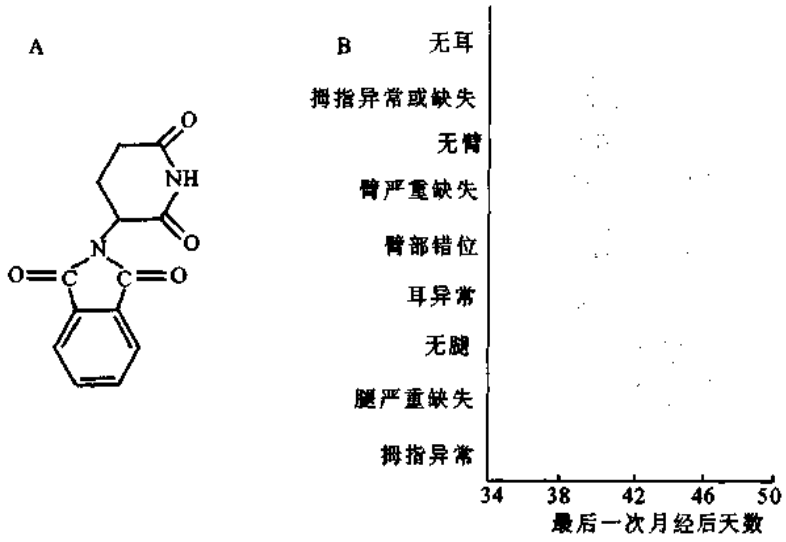


图 20.9 应停的化学结构(A)和应停致畸易感期时间表(B)

喂低剂量应停或向培养上皮细胞内加入低剂量应停,都能导致细胞与细胞之间及细胞与底物之间粘连分子的表达下降。

Lash 和 Saxén(1972)提出了应停致畸作用另一种假说。实验证明原肾、中肾能在培养的肢体组织中诱导软骨生长,而 Lash 和 Saxén 发现应停能在流产胚胎器官培养物中抑制中肾诱导的软骨生长。不仅如此,放射性标记的应停还能特异性地与中肾结合。由此可见,应停选择性致畸作用的分子机制目前还不清楚。只要采用的动物模型仍然是其他灵长类而非人类自身,这就将始终是一个难以解决的问题。

应停悲剧还突出说明另一条重要原则:胚胎的代谢与成人是不同的,对某一器官发挥功能(functioning)没有损害作用的化学物质却能影响该器官的构建。有些成人用药恰恰是胚胎的致畸因子。例如阻止肿瘤细胞生长的药物甲氨喋呤(methotrexate)、镇静剂三甲双酮和苯妥英(phenytoin)以及抗凝剂华法令都是致畸剂。妊娠期间吸烟可能导致胎儿生长迟缓,但尚未发现喝咖啡及服用抗抑郁剂(antidepressant)会导致胎儿发育显著畸形。

(三) 酒精

就其对社会危害程度和发生频率而言,酒精无疑是一种最具破坏性的致畸因子。嗜酒成性的母亲所生婴儿在出生时常患有一种缺陷综合征,即胎儿酒精中毒综合征(fetal alcohol syndrome, FAS)。患有 FAS 婴儿的特征是:头部较小、人中(philtrum)模糊不清、上唇狭窄以及鼻梁较低。FAS 患儿的大脑也明显小于正常儿,且神经元和神经胶质细胞迁移常常出现缺陷。另外,额鼻突(frontonasal process)和脑神经节内有明显的额外细胞死亡。胎儿酒精中毒综合征还是世界排行第三的流行性心理发育迟缓征(位居 X 染色体综合征和唐氏综合征之后);在美国,每 500－750 名新生儿中便有 1 名胎儿酒精中毒综合征患者。

患有 FAS 的儿童身体发育迟缓,心理发育也受阻,其平均智商只有 68 左右。平均实足年龄 16.5 岁的 FAS 患者掌握的功能性词汇只相当于正常的 6.5 岁儿童,其数学能力只有小学 4 年级水平。大部分 FAS 中青年患者不能管理钱财或自己的生活,不能从过去经历中汲取教训。另外,很多 FAS 患者虽然头部大小或智商不存在任何有形变化,但是行为表现异常。母亲和胎儿对酒精的代谢能力存在很大差异;嗜酒母亲所生婴儿中,有 30%～40% 患 FAS。据认为,母亲摄取少量酒精就能导致胎儿酒精效应(fetal alcohol effect)。这是一种程度较轻的 FAS,但是可能导致胎儿功能和智力有所降低。

小鼠模型系统已被用来解释酒精对面部和神经系统的影响。在小鼠原肠胚形成时给予酒精,像在人类一样,能诱导同等程度的发育缺陷。在母鼠饮酒后 12 小时即可观察到发育异常:中线结构(midline structure)不能形成,使面部中央突起不正常地靠近。母鼠饮酒后还能见到胎儿前脑异常,严重时完全缺乏前脑。在受酒精影响的胚胎

中，在额鼻突、脑神经节和腮弓中胚层都可以看到明显的细胞死亡。最近的研究表明，酒精可能通过不止一种机制产生致畸效应。首先，解剖学证据表明神经嵴细胞迁移严重减弱。其次，细胞死亡可能由产生的超氧化物自由基(superoxide radical)引起；超氧化物自由基能使细胞膜氧化，导致细胞裂解。再者，酒精还可能直接阻止细胞粘连分子 L1 把细胞粘连在一起。Ramanathan 等(1996)证明：在体外酒精浓度达到 7 mmol/L 时就能阻断 L1 蛋白的粘连功能；而只需饮一次酒，就能使血液或脑中酒精浓度到达 7 mmol/L。有趣的是，人类 L1 基因突变也能引起心理发育阻滞或畸形综合征，与 FAS 重症状相似。

(四) 其他致畸剂

药物和化学物质并非是惟一导致发育异常的外源性致畸因子。还有另外一些致畸因子包括病毒等。Gregg (1941)发现：如果孕妇在妊娠前 3 个月患病毒性风疹，她将有 1/6 的可能产下一个眼睛有白内障、心脏畸形或耳聋的胎儿。这也首次证明母亲并不能保护胎儿完全免受外部环境影响。妊娠期间，孕妇感染病毒性风疹越早，胚胎畸形的危险性越大。前五周似乎最为关键，因为此时正是心脏、眼睛和耳朵形成期。据估计，美国在 1963～1965 年风疹大流行期间可能造成大约 20 000 名胎儿死亡，30 000 胎儿有先天缺陷。巨细胞病毒和单纯疱疹病毒(*Herpes siplex*)也是致畸因子。巨细胞病毒感染早期胚胎几乎全是致命的，而感染晚期胚胎则导致眼瞎、耳聋、大脑麻痹及心理发育迟缓。

细菌和原生生物很少导致胚胎畸形，但是，也有两种能对人类胚胎造成伤害。弓形体是兔和猫及其粪便携带的一种原生动物，能穿过胎盘而导致胎儿大脑和眼睛损伤。梅毒密螺旋体是梅毒(syphilis)病原体，可以导致早期胎儿死亡，使晚期胎儿产生先天性耳聋。

电离辐射能导致染色体断裂，改变 DNA 结构。正因为如此，孕妇应尽量避免不必要的 X－射线照射。虽然还没有证据说明诊断性辐射可以引起先天性畸形，但是避免 X－射线照射有益无害。高烧发热也可能具有致畸危险。

虽然我们了解一些畸形原因，但是仍不能对大部分先天性异常作出解释。例如，新生儿先天性心脏病发生频率约为二百分之一。其中，8% 的心脏异常是由遗传引起的，大约 2% 可以用已知的致畸剂来解释，而剩下 90% 的原因迄今仍然一无所知。因此，在这方面，人类尚有大量工作要做。实际上，大多数化学物质的致畸效应尚待检测评估。当今人类社会使用的人工化学物质不下 5 000 种，而且每年有大约 200～500 种新化学物质问世。检测这些化学物质的毒性具有重要的意义。目前使用的标准检测方法费钱费时，而且存在种间代谢差异导致评估结果不同等问题。更有甚者，至今还没有一种被普遍接受的检测某一物质对人胚致畸作用的方法。

(五) 环境中的雌激素

在环境毒理学领域，杀虫剂(pesticide)是否与女性乳腺癌发生、男性精子数量减少以及野生动物先天性畸形有关一直存在争论。美国每年用掉近 10^{10}kg 杀虫剂。有些杀虫剂残留物存留于食物链中可达数十年。美国于 1972 年已禁止使用 DDT，但是，DDT 在环境中的半衰期大约为 100 年。最近有证据表明，DDT 及其主要代谢产物 DDE (缺少一个氯原子的 DDT)可能是一种致畸化合物，或者通过模拟雌性性激素或者通过抑制雄性性激素活性而起作用。这些化合物已经和诸如佛罗里达鳄鱼种群减少、鱼类雌性化、乳腺癌增加以及全球性人类精子数量减少等环境问题联系在一起。Guillette 等(1994)认为，佛罗里达 Apopka 湖的 DDT 泄漏事件与鳄鱼出生率下降 90% 以及雄性幼鳄阴茎变小相关。另一种杀虫剂组成成分二恶英(dioxin)可能与癌症发生有联系。暴露于二恶英中的雄鼠后代精子数量降低，睾丸变小甚至缺乏雄鼠特有的性行为。

然而，也有一些学者认为上述说法夸大其辞。虽然杀虫剂能模拟雌激素发挥作用，但只有在大量存在时才会发生。不仅如此，它们与雌激素受体结合比正常雌激素弱近 1 000 倍。某些杀虫剂化合物还具有微弱抗雌激素效能，能把另一些杀虫剂具有的弱雌激素作用抵消。对此，批评者指出，尽管这些化合物与雌激素受体结合微弱，但它们在血清中的浓度是正常雌激素的 100 倍。某些少量的其他活性化合物能协同激发这些具有相对微弱雌激素效能的分子活性。例如，Arnold 等(1996)证明，环境中两种微弱雌激素合用会产生比单用一种大 1 000 倍的效应。Kelce 等(1995)认为，DDT 有害作用可能不在于它本身微弱的雌激素效能，而在于它的代谢物 DDE 潜在的抗睾丸酮(antitestosterone)作用。DDE 浓度在与美国和其他国家污染土壤中发现的 DDE 剂量相当时，能抑制对雄性激素敏感的转录作用。

有些雌激素化合物可能存在于我们每天必吃的食物中以及食品的包装中，因为已经发现一些用于成塑的化学物质具有雌激素功效。塑料稳固剂雌激素功能的发现着实令人大吃一惊。Tufts 大学医学院的学者一直在研究雌激素敏感的肿瘤细胞，这些细胞的分裂需要有雌激素存在。他们的实验一直进行得很成功，但在 1987 年，实验出了问题。他们发现：对照细胞和经雌激素处理的细胞生长同样良好。开始，他们以为是使用了受雌激素污染的培养基所致，于是前后花了 4 个月时间对所有实验溶液进行检验，最后发现，雌激素的"污染"来自盛放蒸馏水和血清的塑料管。生产塑料管的厂家没有通知他们有关稳固聚苯乙烯塑料的新工艺，害得研究人员只好自己去发现。结果发现这一切都是由一种被称为壬基酚（p - nonylphenol）的化学物质引起的。这种化学物质一般用来硬化输水管道的 PVC 塑料以及稳固盛放水、牛奶、橙汁和其他液体的聚苯乙烯塑料。这种化合物也是洗涤剂和家用清洁剂的降解产物。另一个与之相关的物质是戊基酚（4 - tertpentylphenol），它能对培养的人类细胞产生潜在的雌激素效能，使雄性鳄鱼形成输卵管、卵巢组织和卵母细胞。

多氯联苯族（polychlorinated biphenyls，PCBs）是另一类环境雌激素。PCBs 曾被广泛用作致冷剂，但已于 1970 年被禁止使用，原因是发现此类化合物能导致大鼠癌变。然而，这类化合物仍然存留于食物链中，并被认为是导致水獭、海豹、水貂和鱼类繁殖能力普遍下降的罪魁祸首。PCBs 在构型上与二乙基己烯雌酚（DES）相似，并且能和 DES 一样影响雌激素受体，其作用方式可能是与雌激素受体的另一个位点结合。这些化合物的结构都与甲状腺激素相似。甲状腺激素对于内耳耳蜗（cochlea）的生长至为关键。接触过 PCBs 的母鼠产生的后代耳蜗发育不全，听觉有缺陷。

环境中激素调节化合物对人类的影响很难确定。至于人在不同时间摄入的各种化合物构成的合成效应（cocktail effects）则更难确定。在这方面，需要做大量工作研究环境中化合物的生物化学性质及其对发育的影响、发育异常流行病学。目前，来自动物实验的证据表明，人类及动物自然种群可能正在受到环境中激素调节化合物的危害。

第三节 遗传和环境之间的相互作用

同一种物质可对一种动物具有致畸性而对另一种动物则不具有致畸性，这表明遗传因素可能决定一种物质是否可以在正常发育中引起畸形，同时也说明人群中不同的等位基因能够影响一种物质对胎儿是良性还是有害的。例如，过度吸烟的母亲将导致胎儿面部畸形，不过这在整个人群中的危害并不大。但是，如果胎儿的生长因子 TGF - 2 基因有一独特的等位基因（$A2$），那么通过胎盘而吸收的烟雾可使唇裂和腭裂危险提高 10 倍以上。同样，编码乙醇脱氢酶 - 2 的不同的等位基因具有不同的乙醇降解能力，母亲过度饮酒是引起胎儿酒精中毒综合征还是胎儿酒精效应是由母亲和胎儿体内乙醇脱氢酶 - 2 类型决定的。因此，一种化合物是否具有致畸作用取决于许多因素，其中包括接触这种化合物的个体基因。

综上所述，发育通常在富足的环境中进行。许多动物对环境因素很敏感。环境能决定性别表型，并根据季节不同诱导产生非同寻常的结构和化学适应，诱导特定的形态变化以避免个体被捕食，或诱导昆虫等级社会决定。环境还能改变神经元的结构和免疫细胞的特异性。不幸的是，环境也是能破坏正常发育过程的化学物质的来源地。

虽然发育通常是在一个复杂的自然环境中发生，但很容易在实验室条件下进行研究。实际上，研究用的模型系统都是经过驯化的动物，其发育很少受环境因子的影响。然而，随着对发育复杂性的认识，人们意识到环境对发育至关重要。胚胎发育需要一个协调一致的胚胎 - 环境共同体（community）。可以说，环境对发育调控的研究才刚刚开始。

参考文献

1 Arnold S F, *et al*. Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. Science, 1996, 272: 1 489～1 492

2 Bolker J A. Model systems in developmental biology. BioEssays, 1995, 17: 451～455

3 Bry L, *et al*. A model of host－microbial interactions in an open mammalian ecosystem. Science, 1996, 273: 1380～1 383

4 Burnett F M. The Clonal Selection Theory of Immunity. Nashville: Vanderbilt University Press, 1959

5 Conover D O, Heins S W. Adaptive variation in environmental and genetic sex determination in a fish. Nature, 1987, 326: 496～498

6 Degnan B M, Morse D E. Developmental and morphogenetic gene regulation in *Haliotis rufescens* larvae at metamorphosis. Amer. Zool., 1995, 35: 391～398

7 Edmonds D K, *et al*. Early embryonic mortality in women. Fertil. Steril., 1982, 38: 447～453

8 Ferguson M W, Joanen T. Temperature of egg incubation determines sex in Alligator mississipiensis. Nature, 1982, 296: 850～853

9 Gregg N M. Congenital cataract following German measles in the mother. Trans. Opthalmol. Soc. Aust., 1941, 3: 35

10 Guillette L J, *et al*. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. Environ. Health Perspect., 1994, 102: 680～688

11 Hadfield M G. Metamorphosis in marine molluscan larvae. In: Chia R S, Rice M E. Settlement and Metamorphosis of Marine Invertebrate Larvae. New York: Elsevier, 1977, 165～175

12 Hubel D H. Effects of distortion of sensory input on the visual system of kittens. Physiologist, 1967, 10: 17～45

13 Kelce W R, *et al*. Persistent DDT metabolite *p*, *p*′－DDE is a potent androgen receptor antagonist. Nature, 1995, 375: 581～585

14 Lash J W, Saxén L. Human teratogenesis: In vitro studies of thalidomide inhibited chondrogenesis. Dev. Biol., 1972, 28: 61～70

15 McCarver－May D G. Genetic differences in alcohol dehydrogenase and fetal alcohol effects. Abstracts of the Ninth International Congress of Human Genetics. Brazil. J. Genet., 1996, 19: 73

16 McCollum S A, Van Buskirk J. Costs and benefits of a predator induced polyphenism on the gray treefrog. Hyla chrysoscelis. Evolution, 1996, 50: 583～593

17 Nowack E. Die sensible Phase beider Thalidomide－Embryopathie. Human－genetik, 1965, 1: 516～536

18 Ramanathan R, *et al*. Alcohol inhibits cell－cell adhesion mediated by human L1. J. Cell Biol., 1996, 133: 381～390

19 Shaw G M, *et al*. Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor－alpha gene variants. Am. J. Hum. Genet., 1996, 58: 551～561

20 Weele C. Images of Development: Environmental Causes in Ontogeny. Utrecht: Elinkwijk, 1995

第二十一章　发育和进化

有人说，除非和进化联系起来，否则生物学毫无意义。虽然言辞有些过激，但确实把进化在生物学中的重要性突出出来了。当然，不从进化考虑，也很难弄清发育诸多方面的意义。

第一节　达尔文的发育和进化观

早在19世纪初，比较胚胎学家就发现硬骨鱼幼鱼时期的尾和鱼类化石（成体）的尾很相似，随着幼鱼向成体的转变，其尾也逐渐变成我们今天所熟悉的硬骨鱼尾。当时，称这种现象为“变形”（transformation）。变形其实是达尔文之前进化的代名词。有关胚胎发育和进化的关系，胚胎学家Von Baer经过对脊椎动物胚胎发育进行长期研究后，于1828年提出了著名的“生物发生律”（biogenetic law）。其要点是：较高一级动物的胚胎并不重现相关的较低一级动物的成体形式，但是较高一级动物的胚胎发育存在着相关的较低一级动物胚胎相似的阶段。达尔文最早意识到胚胎发育对于了解生物进化的重要性，并把胚胎视为推测动物彼此之间进化关系的可靠线索。他于1859年在 *The Origin of Species* 一书中写道：“The embryo is the animal in its less modified state, and in so far it reveals the structure of its progenitor”。达尔文如此推论是有其根据的，例如他对藤壶（barnacles）作过长期研究。藤壶曾一度被视为软体动物，但其幼虫一经发现之后，人们便立刻明白它和软体动物毫无关系，而是节肢动物。从此，藤壶找到了真正属于自己的“家”。

达尔文还注意到：动物胚胎有时会产生某些与成体不相称的结构，如鼹鼠胚胎的眼、蛇胚胎的骨盆基和须鲸（baleen whale）胚胎的牙齿等，但这些结构都与其他动物显示出某种相关性。在讲述脊椎动物早期发生时，我们也曾提到，哺乳动物胚胎原肠作用以及形成退化的卵黄囊，并向卵黄囊发出血管，所有这些都与鸟类、爬行类胚胎发育过程相似。

达尔文认为，适应能使有机体在特定环境下存活，适应发生在胚胎发育后期。他发现：种和属间的差异正如Baer定律所预期的那样，只有在胚胎发育晚期才发生。因此，达尔文认为应从两个方面观察“变异的世代”（descent with modification）：一是寻找两种或两种以上动物胚胎之间的同源性（homology），强调世代共同性；一是发现动物发育如何改变产生适应特定环境的结构，强调变异（modification）。

达尔文自己并未试图用胚胎学资料对系统发育进行完整的构思，但是，其 *The Origin of Species* 一书却影响了当时许多学者去这样做。例如，Metchnikoff于1891年指出，进化来自于胚胎的变异，而不是成体的变异。当时，普遍认为有机体是通过胚胎发育变化而进化。Haeckel则更加明确指出，任何有机体的进化都是较低一级动物胚胎发育至最后时期之后再增加一个新时期的结果。因此，Haeckel认为整个动物界由低级到高级就代表人类发育的缩影。

假定胚胎发育变化影响进化这一论断成立，那么，胚胎发育变化是如何发生的？在19世纪末，

许多学者试图通过细胞谱系分析把个体发育和系统发生联系起来。他们对胚胎每个细胞进行仔细观察，并比较不同有机体每个细胞形成组织的方式。例如，E. B. Wilson(1898)观察了扁虫、软体动物和环节动物的螺旋型卵裂，发现：不论在哪一种动物中，同样的器官总是来源于同一组细胞。因此，他认为这些动物享有共同祖先。Wilson 特别强调运用胚胎同源性建立系统发育关系。与此相对，F. R. Lillie(1898)则强调卵裂变异性而不是相似性。Lillie 发现：贻贝(*Unio*)卵裂会发生改变，产生钩介幼虫(glochidium)，在水中流动生活。他认为：研究进化最好集中于研究使动物能在特定环境下生存的胚胎发育变化，而不是集中于研究同源性。至此，对发育和进化的研究出现两种主要方法：发现各类不同动物之间的基本统一性和发现各种动物适应特定环境的发育变化。这两种方法至今仍是研究发育和进化的主要手段。达尔文认为：动物统一性和发育变化在时间上可以分开，也就是说在动物发生早期可以发现统一性，而在发育后期则发生歧异适应环境。遗憾的是 Wilson 和 Lillie 仅仅讨论了卵裂时期的胚胎发育。

第二节　胚胎起源

多细胞生物起源于单细胞生物。多细胞生物的出现是形成新的复杂有机体的关键一步。团藻(*Volvocaceans*)和网柱菌(*Dictyistelids*)是 17 种多细胞原生生物的代表。在 17 种多细胞原生生物中，只有 3 种(即产生真菌、植物和动物的多细胞原生生物)进化形成多细胞聚合体，分化出特定细胞类型。由特定类型细胞构成的多细胞聚合体即最早的胚胎。

最早的胚胎必须解决一个基本问题，即在保存每个组成细胞分裂能力的同时，分化出一组组可以行使特定功能的细胞。Buss 认为：在早期胚胎中，存在明显的分裂和进化分工，而原生生物祖先一旦分化出纤毛后，就再也没有获得过分裂能力。虽然某些原生生物尤其是纤毛虫能产生多个微管组织中心(microtubule－organizing center)，但是我们的祖先则不能形成多个微管组织中心。直至今天，具纤毛的后生动物细胞仍然不能分裂。Buss 推测：当今具纤毛的后生动物的祖先通过分化成由具纤毛细胞组成的胚胎而失去细胞分裂能力。这些纤毛囊胚样有机体能够运动，但其发育已经停止，因为具纤毛细胞既不能分裂也不能成为其他分化类型细胞。要发育成多细胞有机体，早期胚胎必须解决分裂与进化这一对矛盾。

早期胚胎通过保留或产生无纤毛细胞解决了分裂与分化的矛盾。无纤毛细胞分裂产生新细胞，而具纤毛细胞使胚胎能够运动。但是，正在分裂的胚胎细胞哪里也去不成：它们不能在具纤毛细胞上生长，否则具纤毛细胞便不能运动；它们也不能生长到水中，否则它们会拖累胚胎运动。相反，正在分裂的胚胎细胞可以迁移到囊胚腔内(图 21.1)。据认为，原肠作用就是起源于细胞的这种分裂和运动。因此，囊胚由自主细胞形成“联邦”(federation)而产生；而原肠作用则通过“联邦”内部的折中妥协即在胚胎运动的同时又能够发育而形成。

最早的胚胎可能就是以这种镶嵌方式发育。不过，诱导作用使胚胎又形成一种保证全能的裂球维系在一起产生有机体的机制。在有机体个体中，每个细胞都以牺牲自主性为代价，创造一种协调一致的细胞共同体。Henry 等(1989)发现：虽然早期海胆胚胎每个裂球可能都是全能的，但是由这些全能细胞构成的聚合体中的每个细胞则不是全能的。相反，全能细胞构成的聚合体中每个细胞都对毗连细胞发育潜能形成一种限制。在嵌合小鼠中也能看到这种限制作用。不仅如此，内部细胞一旦和

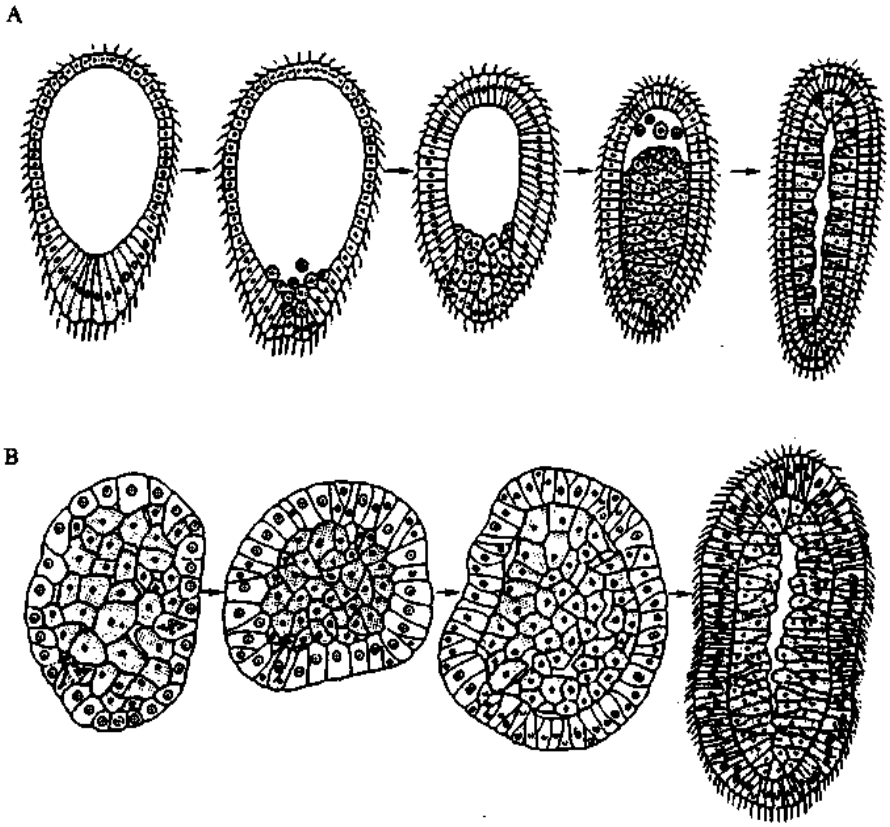


图 21.1 两种水螅的原肠作用

A. *Aequoria foskalea* 的原肠作用。囊胚细胞具纤毛;植物极细胞失去纤毛,迁移到囊胚腔,形成有丝分裂细胞群。

B. *Clava squamata* 的原肠作用。实心囊胚外层细胞形成纤毛,内层细胞和外层细胞内表面紧贴在一起,中间出现空腔。最终,形成水螅特有的浮浪幼虫(planula larva)。在自由游泳的胚胎中未见到无纤毛外胚层细胞下包现象

外部细胞以及其他部分内部细胞发生作用,诱导事件便出现了。诱导作用导致形成新的器官。

无论细胞共同体以哪种方式形成,细胞整合形成统一的胚胎都是由母体向卵细胞质内提供物质实现的。正是由母体向卵细胞质内提供的物质决定细胞以一定方式分裂,并彼此"粘"在一起,在特定时间分化。正如所知,海胆胚胎细胞核转录作用即使被抑制,照样形成纤毛囊胚;细胞核只有在原肠作用时期才开始对胚胎产生调控作用。因此,在细胞增殖水平上的选择可能紧随多细胞生物个体水平上的选择而发生。

第三节 新门类的形成

据认为,多细胞生物体是在 15 亿年前产生的,普遍接受的最早的多细胞动物化石可以追溯到 6 亿年前。现有的动物大约分为 35 个门类,每一门类动物都具有其独特的形体模式(body plan),并且又都是从大约 5 亿年前的寒武纪(Cambrian period)末进化而来。虽然不同门类动物的形体模式已经发生改变,并发展出如鱼类和哺乳类等不同的有机体,但是从寒武纪以来,再没有进化出新的基本的形体模式。

有机体是如何从一种形体模式进化出另一种形体模式的呢？首选的途径可能是改变最早期的胚胎发育阶段。根据 Von Baer 定律，同一属内不同种动物在发育晚期才出现歧化。因此，雪鹅(snow goose)和蓝鹅(blue goose)在胚胎发育至最后阶段之前很难区分开来，而鹅胚胎和蜥蜴胚胎则在发育早期就可以区分开来。显然，产生新的形体模式的突变可能通过改变早期的胚胎发育阶段而发生。

早期的发育变化可能受细胞质决定子分布改变的影响，也可能受一个细胞或一组细胞分裂速度改变的影响，还可能受细胞分裂时位置改变的影响。例如，软体动物卵裂的改变能使大量细胞质进入形成幼虫贝壳的外胚层细胞中，这是由于裂球分裂方式和细胞质分配方式改变的结果。在环节动物中，多毛类和寡毛类的区别产生于卵内形态发生子在细胞质内分布位置的差异。虽然它们都进行螺旋卵裂，但是却把形态发生决定子分配到不同的细胞内：多毛类行相对标准的螺旋卵裂，把相当一部分细胞质分配到形成幼虫结构的裂球中，胚胎发育产生单轮幼虫；相比之下，寡毛类把大部分细胞质分配到预定形成成体的细胞内，而不是形成幼虫结构的细胞中，因此其发育不存在幼虫阶段(图 21.2)。如果突变把某些细胞质形态发生子从卵内一个区域转移到另一区域，或者突变引起细胞分裂轴性改变，使不同的细胞获得有关形态发生子，那么，就可能产生完全不同的表型。正如 Conklin 于 1915 年所说："我们之所以是脊椎动物，是因为我们母亲是脊椎动物，并且产生脊椎动物类型卵子。"

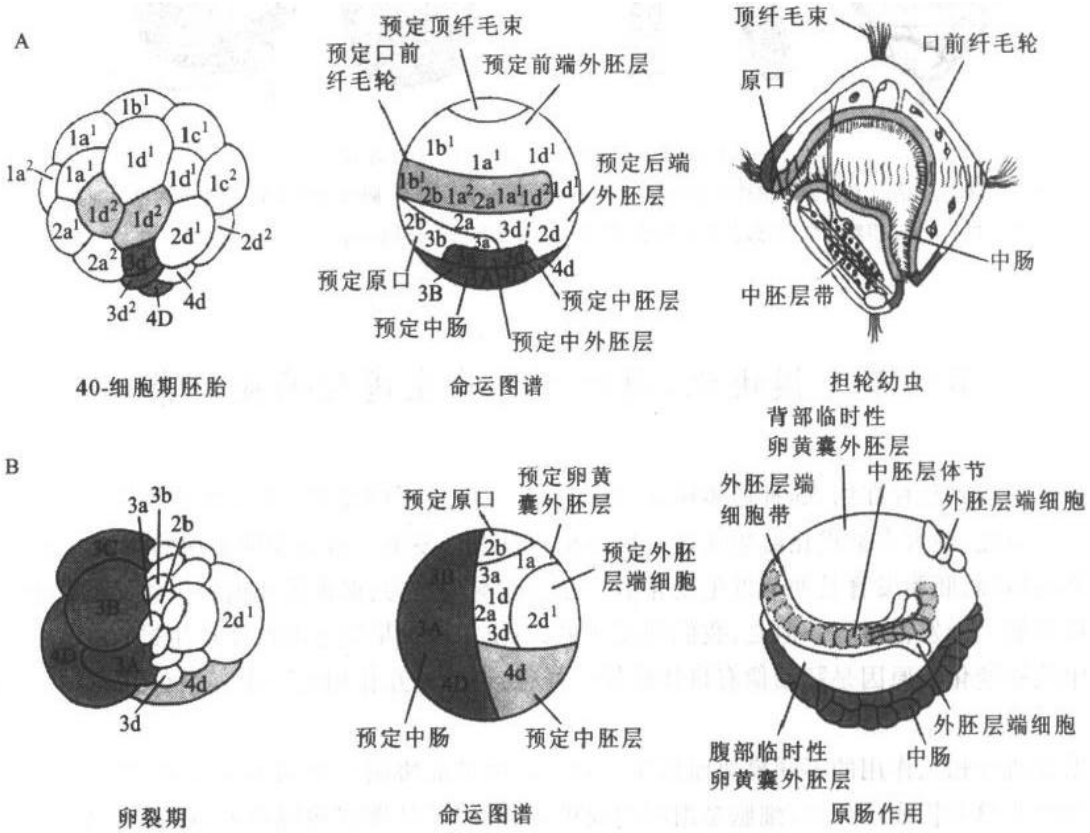


图 21.2　两种环节动物多毛类健足虫(*Podarke*)(A)和寡毛类管作虫(*Tubifex*)(B)的发育比较

正在卵裂的胚胎发育命运图谱以及原肠作用产物如图所示。在健足虫中，原肠作用导致担轮幼虫形成；而在管作虫中，不存在幼虫期，胚胎直接发育成分节的有机体

形成新门类的另一种途径可能与幼虫变异有关。达尔文等认为:幼虫形态相似性表明它们具有共同血统。这也可以解释为产生不同动物门类的变化可以在幼虫中发生。蜗牛、蠕虫和多毛类卵裂形式非常相似,且都形成单轮幼虫(图 21.3)。实际上,把新发现的罩翼目(Vestimentifera;深海发现的鲜红、无消化道的无脊椎动物)的分类位置放到靠近环节动物处,部分根据就是罩翼目动物发育形成单轮幼虫。因此,新门或新纲形成的主要机制之一是幼虫期发育产生改变,接着再经变态形成新型组织结构。Garstang 于 1928 年就曾提出一种假设:脊索动物由原始海鞘幼虫经幼态成熟发育而成。遗憾的是,这类无骨骼幼虫很难形成化石,所以我们对脊索动物以及其他门类可能由早寒武纪幼虫进化产生的机制所知甚少。

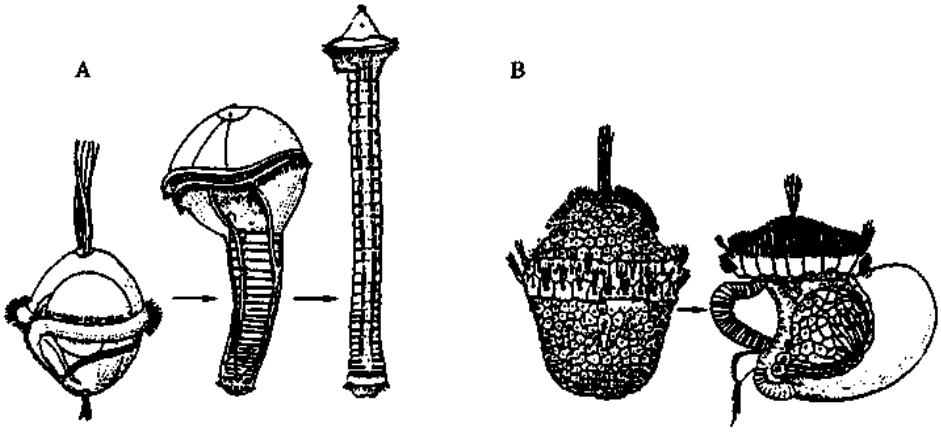


图 21.3 担轮幼虫期之后的发育歧化

A. 多毛类 *Polygordius* 自由游泳担轮幼虫变态,形成分节躯干部分。最终,随着头部形成,幼虫前端结构萎缩

B. 软体动物 *Patella* 担轮幼虫变态,发育形成足、壳腺和内脏隆起(visceral hump)

第四节 模块化:通过发育产生进化的先决条件

虽然动物界只存在约 35 种形体模式,但却有几百万种不同动物,且每种动物都具有自己的发育模式。因此,绝大多数进化必须在现有形体模式框架内发生。这是如何实现的?发育如此复杂,调节如此精细,胚胎发育是如何发生变化的?一度曾有人认为:促进进化的惟一途径是在胚胎发育末期再增加一个发育步骤。但是,我们现在知道,即使在发育早期也能改变产生进化新结构。发育过程中能够变化的原因是胚胎像有机体成体一样,由彼此相互作用的一系列组件或模块(modules)构成。

发育通过相互作用的不同模块而发生。有机体由彼此协调一致的单元构成,单元又由彼此协调一致的亚单元构成。例如,细胞是组织构成单元,组织又是器官构成单元,而器官又是系统构成单元,等等。Dyke(1988)称这种等级系统为等级相互作用模块排列(level-interactive modular array)。发育过程中,等级相互作用模块包括形态发生场、成虫盘、细胞谱系、昆虫副体节(parasegment)和脊椎动物器官原基。模块单元能使身体不同部分在不影响其他功能的情况下发生变化。

模块化（modularity）的基本原理是允许分离（dissociation）、复制和变异以及协同选择（co-option）三个过程改变胚胎发育。由于模块包括从分子到有机体各个层次水平，因此，模块化基本原理能在各个发育水平发挥作用。

一、分离：异时性和异速生长

胚胎并非所有部分都彼此联系。把蝾螈神经胚附肢部分去除，并不影响其眼睛的发育。通过突变和环境干扰，胚胎某一部分可以独立于其他部分而发生变化。胚胎发育的模块化使胚胎发育可以发生时空变化。异时性（heterochrony），是指胚胎发生过程中，两个发育过程相对时间选择的改变。换言之，一个模块可以改变其相对于胚胎另外一个模块的表达时间。蝾螈幼体阶段性细胞初期发育（progenesis）也称为幼态成熟（neoteny）过程中就存在异时性。热带蝾螈属成员之间爪的差异最能说明发育时间的改变对不同动物形态和生态习性所起的作用。*Bolitoglossa* 属的许多种类生活在树上，而非典型的陆生动物，其爪发生了改变，适应于攀登光滑的树面。树栖种类的爪比陆栖种类的小且具蹼，趾很短（图 21.4）。这些差异主要是由于树栖种类的爪停止生长发育要比陆栖种类早的缘故。

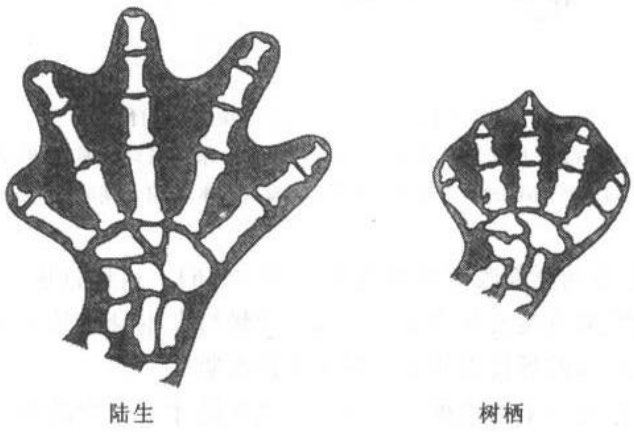


图 21.4　蝾螈的异时性

Bolitoglossa 陆生种类比树栖种类足大，趾长，且蹼小。这种差异完全由树栖种类足停止生长发育较早造成

具有幼体阶段的动物，其开始性成熟时间的改变也说明异时性问题。动物在幼体阶段获得性成熟称为幼态成熟。动物的发育（而不是生长）随着生殖器官的成熟而减慢。墨西哥美西螈就存在幼态成熟现象：幼体长大，并逐渐成熟，但是不发生变态。性成熟的个体仍生活在水生中，看似过度生长的幼体。用甲状腺素处理可以诱发其变态（图 21.5）。

幼体阶段可能由异时性进化而来。如果假设蛙的祖先直接发育为成体，那么，神经胚后期发育事件出现的时间改变与结构改变一起就能导致摄食蝌蚪时期的出现。所需的改变之一就是附肢发育延缓。某些现代两栖类进化成直接发育：失去幼体阶段，加速成体特征发育。不像爪蟾等典型的两栖类，*Eleutherodactylus* 属的蛙类可直接发育为成蛙，不存在水中生活的蝌蚪时期，其卵子产于陆地上。在 *Eleutherodactylus* 属发育过程中，鳃和粘液腺等典型蝌蚪特征不出现；神经管形成后不

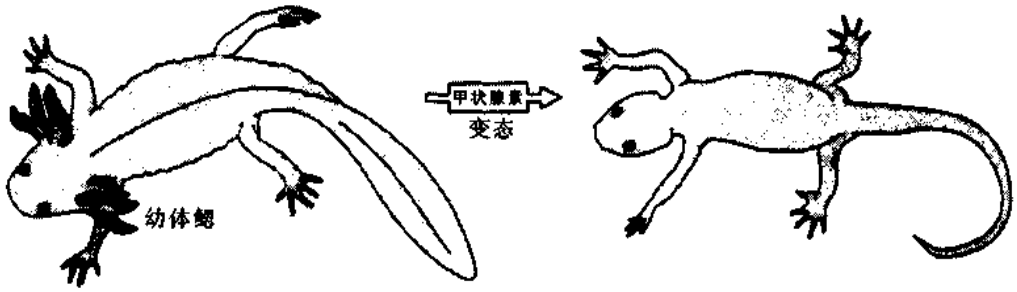


图 21.5 蝾螈的幼态成熟

性成熟美西螈仍保留幼体特征(如鳃),且保持在水中生活。这种幼态成熟形态用甲状腺素处理,即变态形成典型陆生型蝾螈

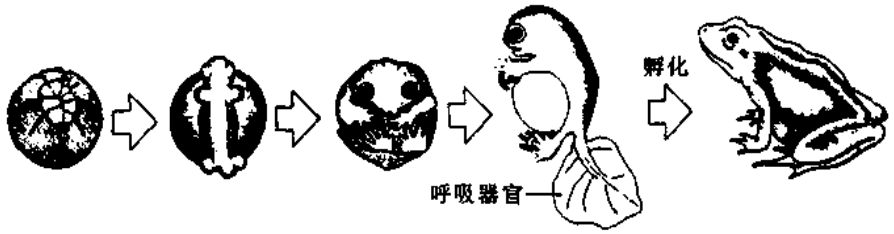


图 21.6 *Eleutherodactylus* 的发育

典型的两栖类如 *Xenopus* 和 *Rana* 把卵子产于水中,发育经过一个水生蝌蚪时期,蝌蚪变态后形成成体。相比之下,*Eleutherodactylus* 把卵子产于陆地上,不经过水生幼体阶段直接发育成成体,其胚胎期的尾部变成呼吸器官

久就出现明显的肢芽;胚胎的尾部改变成呼吸器官(图 21.6)。这种直接发育需要卵子储存大量卵黄,向胚胎提供营养,使之能直接发育为成体。卵黄含量增大本身就是异时性的一个例子,它涉及到卵子发生时卵黄合成时间的延长或卵黄出现迅速合成期。

多数海胆的发育要经历一个月或更长时间的幼虫阶段才发育为成体,但是也有一些种类经过进化,不需要经历幼虫时期而直接发育为成体。直接发育的海胆的卵子直径很大,由其受精卵发育成幼海胆的时间一般在 4 天以内,发育十分迅速。这就需要早期发育发生改变,使直接发育的胚胎所形成的既无消化道又不能摄食的幼虫迅速变成为幼海胆。

通过不同方法都能导致异时性。蝾螈保持幼虫阶段的异时性由诱导感受系统中基因突变引起。其他异时性表型可以通过某些基因异时性表达而产生。成体海胆器官原基的直接发育就与成体基因提前激活和幼虫基因表达被抑制有关。异时性可以使有机体返回到幼虫状态,而不必经过特化适应成为成体。异时性还可以赋予成体幼虫特征,如树栖蝾螈小而具蹼的爪和人类新生儿脑组织维系胚胎生长速度等。

模块化的另一个结果是异速生长(allometry)。当有机体不同部分以不同速度生长时即出现异速生长。异速生长在形成不同形体结构方面十分重要。异速生长不同的生长速度变化可能与靶细胞对生长因子敏感性改变或生长因子产生数量有关。脊椎动物附肢为异速生长提供了绝好的例证。马附肢中软骨组织局部差异导致中趾生长速度比其他侧趾生长速度快 1.4 倍,因此,中趾比侧趾长。在进化过程中,随着马个体大小不断增加,这一生长速度的不同导致中趾更长,相对较小的

侧趾不再着地，最终由五趾马变为单趾马(图 21.7)。进化过程中另一个异速生长显著的例子是颅骨发育。在鲸胚胎中，鼻孔位于哺乳类正常位置，但是上颌骨和前颌骨大量生长推挤额骨，迫使鼻孔位移到颅骨顶端。鼻孔位于颅骨顶端使鲸获得大而特化的颌器，并在与水面平行游泳时可以正常呼吸。

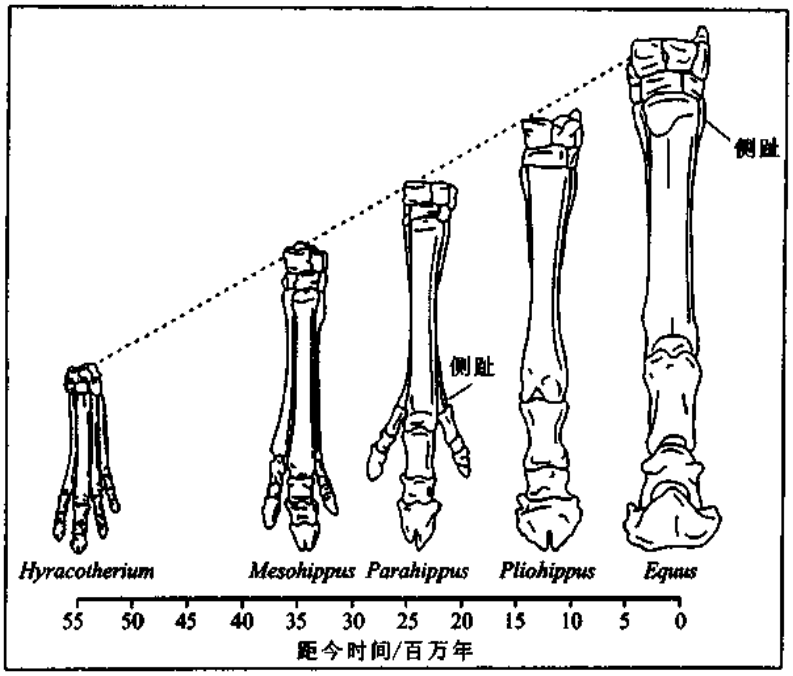


图 21.7　马前腿的进化

最早的马科动物 *Hyracotherium* 只有狗一样大小，其前踏 4 趾，其中第 3 趾(解剖学上)生长较快，略长，但是所有 4 趾均着地。随着马身体变大，中趾变长，侧趾和地面不再接触。再后来，侧趾越变越短，最终变为单趾马

二、复制和变异

模块化可以允许复制和变异发生。复制形成多余结构，而变异则能使多余结构获得新功能。复制形成多余结构后，其中一个可以保持原有功能不变，而另一个则可自由突变，功能发生歧化。这可以在各种水平上发生。TGF－β 家族、MyoD 家族和珠蛋白开始时可能都是单基因，后来经过数次复制，再经突变导致变异，赋予每个家族成员新功能。在组织水平，我们已经观察到体节复制、变异和颈椎、胸椎和腰椎产生等现象。

某些特定发育模式也可以发生复制和变异。上皮和间充质相互作用可能开始于单一的外胚层细胞和间充质细胞之间的相互作用。表皮分泌腺和乳腺由同一类型诱导作用变化形成：乳腺是胚胎发育过程中由汗腺演变成的。同样，令人生畏的鲨鱼牙齿由身体鳞片演变而来。诱导作用的变化还能把鳞片变成羽毛。

三、协同选择

没有一种结构是预定专为某种特定目的而存在的。*Engrailed* 基因先用于果蝇胚胎分节，后

用于决定神经元,在幼虫阶段又用于使成虫盘形成前后极轴。同样,在肝脏中行使酶功能的蛋白质可以在晶体中作为结构蛋白发挥作用。换言之,既存单元可以根据需要产生新功能。这种协同选择也见于组织学水平。脊椎动物的翅在进化过程中发生过三次演化。每一次演化时,前肢结构都演变执行全新的功能。

协同选择最有名的例子是利用胚胎颌部组分形成哺乳类中耳。神经嵴细胞是脊椎动物特有的胚胎组织,原索动物和无脊椎动物都不具备。原索动物具有位于背部的神经管和脊索,但无真正的头。头部神经嵴细胞主要形成面部、颅骨和鳃弓。据认为,头部发育开始主要为了更有效摄食,因此感觉器官在靠近行使摄食功能的颌处形成。在脊椎动物颌进化过程中,出现两个显著的转变:一是由无颌类鳃弓形成颌;二是利用爬行类上下颌连接的关节骨形成中耳的锤骨和砧骨(图 21.8)。在最早的脊椎动物中,一系列鳃裂开口于无颌类口之后。当鳃裂获得软骨成分支撑时,第一对鳃支撑物包围口形成颌。有充分证据证明颌是由鳃支撑物演化而来。首先,颌和鳃两者的骨骼都由神经嵴细胞形成。其次,两者都由向前弯曲并在中央铰合的上下两根棒状结构产生。再者,颌肌和支撑鳃的肌肉同源。因此,第一对鳃弓软骨最先从鳃支撑物转变成颌器。

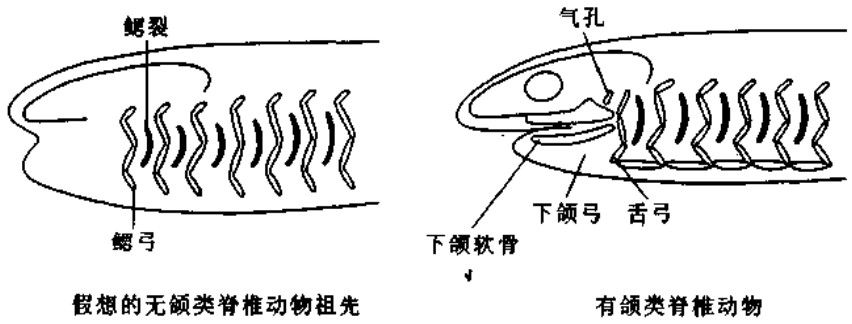


图 21.8 脊椎动物颌进化过程中鳃弓的变异

鱼类无颌类祖先有由软骨或硬骨支撑的 6 对鳃裂。第一对鳃弓变异产生下颌弓、下颌软骨和舌弓,由此形成颌

当陆生脊椎动物祖先离开海洋登陆后,再也不需要鳃了;但是产生鳃的胚胎结构仍然存在。随着时间的推移,它们经过改造,形成包括人在内的哺乳类面部和颈部的不同结构:介于第 1 和第 2 对鳃弓之间的鳃裂形成咽鼓管开口,鳃裂中内胚层细胞形成甲状腺和胸腺等各种腺体。

由水生向陆生的进化很少产生全新的结构。新的解剖特征通常是由已有的结构改造而成。因此,可以认为:大多数进化是对现存结构的"修改",逐渐塑造出不同的结构。哺乳类中耳的进化为已有结构改造导致进化提供了很好的例证。中耳是由从鼓膜传递声音到内耳的 3 块听小骨构成。在哺乳动物的爬行类祖先中,颅骨的方骨和下颌的关节骨把颅骨和下颌连接在一起。颅骨方骨和下颌关节骨也与爬行类声音的传递有关。在哺乳类进化过程中,下颌演变成一块齿骨,关节骨不再与下颌连接。通过在发育过程中的改变,下颌关节骨和颅骨方骨被改造成锤骨和砧骨,其功能是把声音从鼓膜传递到内耳。

对已有结构改造导致进化的又一例证是脊椎动物肾脏的进化。在鸟类和哺乳类的胚胎发育过程中,出现 3 种肾脏样结构,即后肾、中肾和前肾。前肾和中肾是过渡性结构,只有后肾发育成有功能的肾脏。不过,中肾在性腺发育过程中起重要作用,形成精巢和卵巢中的体细胞。在鱼类和两栖

类等低等脊椎动物中，前肾在未成熟幼年阶段执行着肾脏的功能，而中肾是成年动物有功能的肾脏。因此，鸟类和哺乳类祖先的胚胎肾脏（前肾和中肾）作为胚胎结构持续存在，只不过经过改造成为性腺发育的必要结构罢了。

四、关联发育

所谓关联发育（correlated progression），是指胚胎一部分的变化能诱导另一部分的变化。软骨诱导肌肉形成，而肌肉又诱导神经元形成。这样一来，如果一个结构变化，随之将诱导另一个结构跟着变化。从无颌类到有颌鱼类，从有颌鱼类到两栖类以及从爬行类到哺乳类，骨骼排列的显著变化都与颌结构、颌肌肉、牙齿沉淀和形状以及头拱顶和耳变化协调一致。

在家畜中，可以看到短期内发生的关联发育。人类在选择家畜遗传变异方面很有天赋。人类所选择的变异一般都与形成家畜的前额突和下颌突的神经嵴细胞有关。例如叭喇狗（bulldog）是人们选择出的宽脸以及头和颌之间角度很小的品种，而大牧羊犬（collie）则是选择出的窄鼻、头部向外突出的长颌品种。所有狗品种虽然头部骨骼形状和位置不同，但颌都能移动，都会摇头，并会叫。每一品种都由遗传基因决定。每一变种都是不同骨骼彼此之间以及肌肉之间和谐排列的代表。一旦选择了一定骨骼形状的狗，相应也就选择了使骨骼运动的肌肉、控制肌肉运动的神经以及给肌肉提供营养的血管。

第五节　发育制约因素

不同发育模块之间都能彼此相互作用。发育模块之间的相互作用不但限制了它们可能产生的表型，而且使它们更容易朝某一方向而不是其他方向发生变化。这些对表型发育的限制总起来称为发育制约（developmental constraint）。

一、物理制约因素

前面已经提到过动物只有相对不多的35种形体模式。除现有动物门类形体模式之外，很容易想象出另外的形体模式。但是，动物界为什么未出现更多的形体模式呢？这是因为存在某些制约进化的因素。首先是对有机体发育的物理制约，即来自扩散、水力和物理支撑的限制，这些制约只允许某些有机体能够发育，而不允许另一些有机体发育。不难想象：在轮状旋转的附肢上不可能形成脊椎，因为血液无法循环到旋转器官上，因此，这种进化可能性被彻底排除。同样，结构因素和流体动力学决定世界上不可能存在有5尺高的巨型蚊子。

二、形态发生制约因素

对形态建成原则也存在限制。Bateson（1894）曾注意到：有机体只能按有限几种方式偏离正常发育途径。有关这方面研究的主要目的是试图找出有机体构建的结构参数，并弄清这些参数在进化过程中是如何变化的。最好的例子来自对脊椎动物附肢形成的分析。Holder（1983）指出：过去300万年中脊椎动物附肢已发生许多变化，但有些变化如中指比两边侧指短这种变化从未见到过。不仅如此，自然种群分析表明，附肢发生变化的方式相对很有限。如果在一定环境下较长的附肢有

利，肱骨便会延长。还从未见过两块小肱骨串联起来形成较长肱骨，虽然不难想象这种方式可能具有选择优势。这说明形态建成有一定原则。

Oster 等发现：用扩散作用模型能够解释已知的脊椎动物附肢形态以及为什么未出现其他附肢形态。扩散作用模型假定软骨的聚集主动调动周围更多细胞参与骨骼形成，而在侧面方向上则抑制细胞聚集。细胞聚集点的数量取决于组织的几何形状以及侧向抑制的强度。如果抑制作用相同，组织体积大小要增加，就必须在原有一个细胞聚集点上出现两个细胞聚集点。这一数学模型的证据来自实验分析和比较解剖学。当蝾螈肢芽经秋水仙素处理后，附肢体积缩小。在这样的附肢中，不仅指缩小，而且正如数学模型所预期的那样，一定是按一定顺序某个指缩小。再者，特定指的缩小和初期发育的蝾螈附肢相似。因此，用扩散作用机制构建附肢，便限制了发育过程中附肢形成的可能性。

三、系统发生制约因子

系统发生制约因子是建立在动物发生遗传学基础上的历史性限制因素。例如，某种结构一旦经诱导作用产生后，就难以重新启动新的发育程序。在鸟类和哺乳类成体中，在原索动物成体中仍具有功能的脊索只是一种残留结构，但是在胚胎中脊索都是神经管特化所必需的结构。同样，虽然鸡胚原肾是一种残留结构，但是它是鸡胚发育过程中构成输尿管芽(ureteric bud)的原始材料，能诱导形成有功能的肾脏。

Raff 等(1991)认为：发育的最初阶段最难改变，因为改变最初的发育阶段要么意味着毁坏胚胎，要么意味着产生全新的表型。但是，近来有证据表明：卵裂能发生改变而不必干扰最终形态。软体动物胚胎中形态发生子的改变能产生新型幼虫、新型幼虫仍能变态形成软体动物。海胆细胞质形态发生子的变化能导致海胆发育不必经历幼虫时期而直接发育成小海胆。

尽管脊椎动物早期发育方式各不相同，但都经历相似的系统发生型阶段(phylotypic stage)，有时称为咽神经胚(pharyngula)；随后，发育又趋歧异(图 21.9)。脊椎动物共有的系统发生型阶段即神经胚形成和体节形成之后的胚胎时期，可能是脊椎动物远缘祖先都必须经历的时期。从那时起，尽管系统发生型阶段之前和之后不同动物发生了不同的进化，但系统发生型持续至今，已成为所有脊椎动物发育的基本特征。脊椎动物形成咽神经胚的方式各不相同：鸟类、爬行类和鱼类经过不同方式的局部卵裂到达咽神经胚期；两栖类通过辐射状完全卵裂到达咽神经胚期；而哺乳类则通过形成胚泡、绒毛膜和羊水到达咽神经胚期。因此，发育最初时期也极具可塑性。同样，发育后期也有很大可塑性，小鼠、太阳鱼、蛇和蝾螈等各种不同的表型足以说明这一点。相比之下，发育初期和后期之间的中期阶段似乎存在着不可塑性。

Raff(1996)认为：新的形体模式的形成被神经胚内广泛存在的诱导作用所抑制(图 21.10)。在神经胚之前，胚胎中存在很少几个诱导事件；而在神经胚之后，出现大量诱导事件。几乎所有这些诱导事件都在一定模块内发生。但是，在早期器官发生中，有几个诱导事件同时发生，面积涉及整个胚胎。此时，模块彼此重叠，并相互作用。在脊椎动物中，初期阶段与胚轴决定、原肠作用有关，诱导作用尚未大量发生。不仅如此，初期阶段存在较大调整能力，所以形态发生子分布或卵裂平面位置的很小变化是可以调整的。当主要形体模式决定后，诱导作用在胚胎全身各处出现，但都被分隔在各个不同的器官形成系统中进行。晶体诱导角膜形成，即使诱导失败，也只有眼睛受到影响。同样，皮肤中的诱导作用诱导产生羽毛、鳞片或皮毛，即使诱导失败，也只是皮肤或某块皮肤缺乏羽

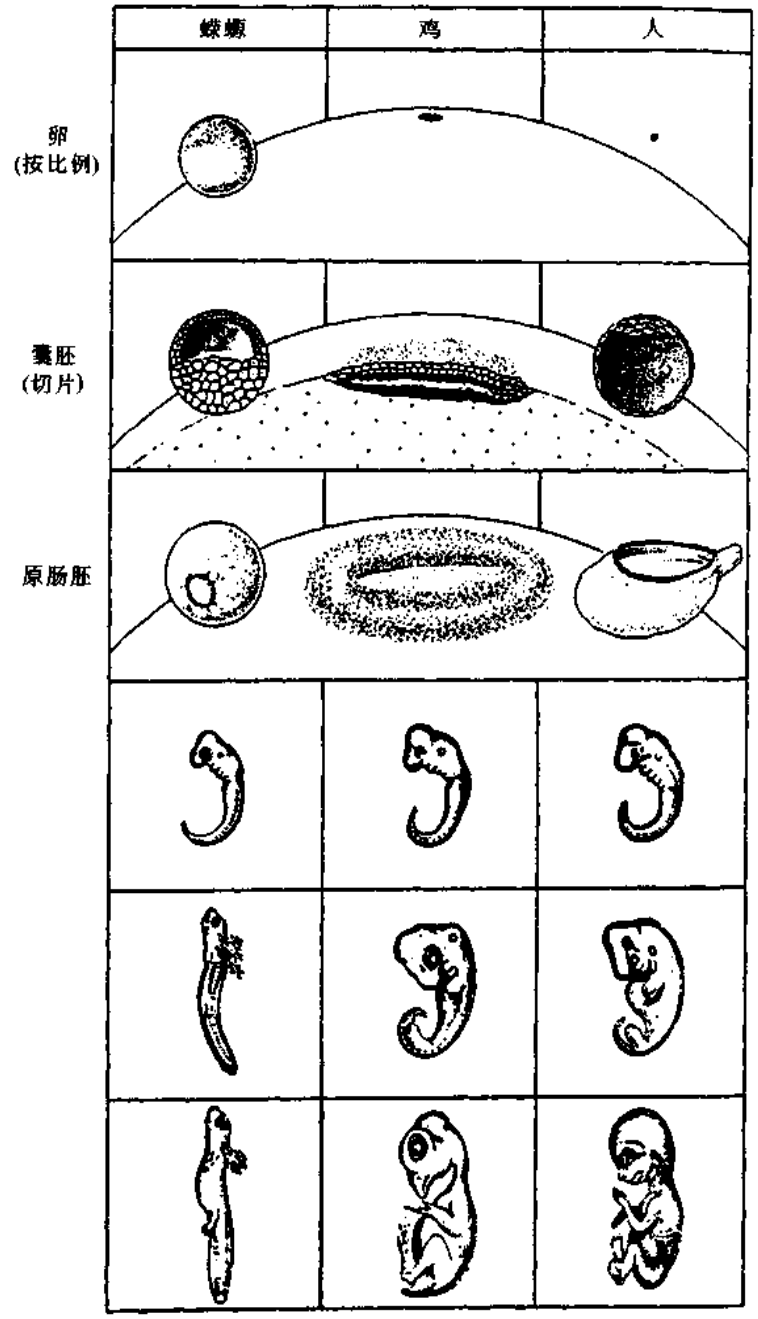


图 21.9　脊椎动物发育瓶颈期——咽神经胚

图下半部示 Von Baer 定律，表明在共同的咽神经胚之后不同纲的脊椎动物发生歧异；图上半部代表发育开始时的歧异性

毛、鳞片或皮毛而已。在器官发生早期，诱导作用更具普遍性。心脏某些地方出现缺陷可能影响眼睛诱导作用；某些区域中胚层诱导中出现缺陷可能导致肾脏、附肢和尾畸形。对进化的制约作用正是在这一时期出现；也正是在这一时期形成脊椎动物典型门类。因此，一旦成为脊椎动物，就很难变成另外类型的动物。

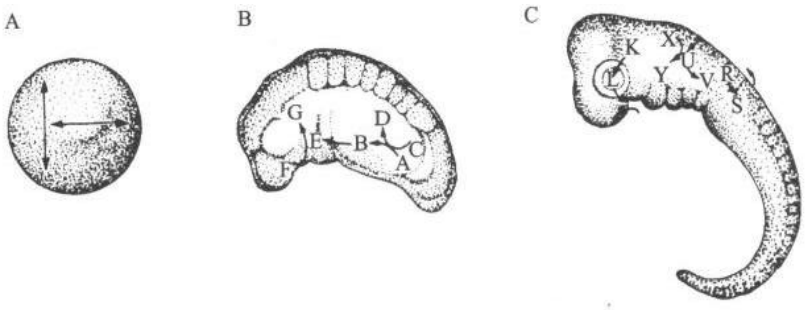


图 21.10 脊椎动物发育瓶颈期的形成机制

A. 卵裂期，存在少数几个涉及整个胚胎的相互诱导作用 B. 神经胚至咽神经胚期，存在大量广泛的相互诱导作用 C. 咽神经胚之后，出现大量诱导作用，但这些诱导作用都在局部发生

四、配体和受体协同进化：生殖隔离

还有一种发育制约因素涉及一个组织和另一组织相互作用能力。发育事件必须总体协调一致，有机体才能存活。配体(ligand)必须和受体协调，它们必须在适当部位和适当时间表达。配体变化必然伴随受体的互补变化，才能使受体发挥作用。但是，如果配体(或受体)结构变化太大，便无法与受体(或配体)结合，发育就会停止。配体和受体的互补变化可能导致功能分离，如同在激素家族及其受体进化中所见到的那样。

如果配体和受体是精子和卵子上的蛋白，那么功能分离就能够导致生殖隔离和物种分离。虽然相关海洋动物多数蛋白非常相似，但参与受精的蛋白质则极其不同。在海胆中，精子结合素(bindin)以及卵子上与结合素互补的受体发生协同进化，所以每一种海胆结合素蛋白都不能识别

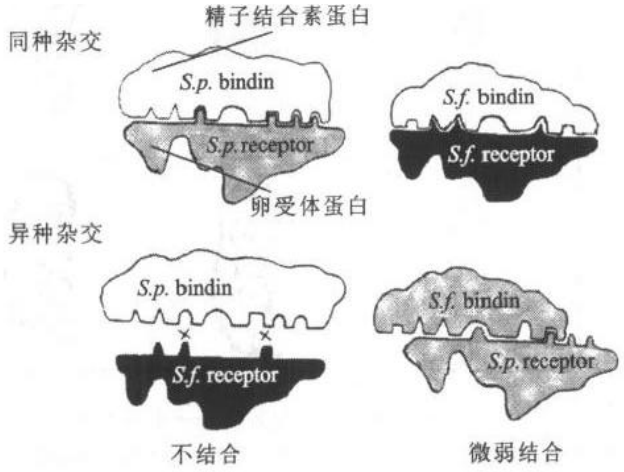


图 21.11 两种相关海胆精卵识别模式

Strongylocentrotus purpuratus 精子能和同种卵子中受体结合。同样，*S. franciscanus* 精子也能和本种卵子中的受体结合。在上述两种海胆之间，*S. franciscanus* 精子可以和 *S. purpuratus* 卵子微弱结合，但 *S. purpuratus* 精子不能和 *S. franciscanus* 卵子结合。据推测，每种海胆结合素中的重复片段都可以与其互补的结合素受体相互作用。结合素及其受体的共同进化可能导致了上述海胆分离形成两个种

另一种海胆卵子表面上的结合素受体。Hofmann 和 Glabe(1994)假设:结合素及其受体之间存在几种不同的识别位点;突变将导致某些位点改变,这又导致对相应配子上互补位点变化进行选择;可能存在某个时期,精子和卵子结合很微弱,但是,突变最终导致形成生殖完全隔离的两种动物。在鲍中,溶素蛋白(lysin protein)及其受体很小区域的突变就能决定鲍受精的种的特异性。不仅如此,溶素和结合素的变化进化很快,并与物种形成(speciation)相关(图 21.11)。

第六节　DNA水平的变化和发育进化

有机体发育是基因型到表型转化的结果。在进化过程中发生的所有动物形态的改变归根结底是由于 DNA 发生变化的结果。例如,现代昆虫和脊椎动物之间的差异,是自它们享有最后共同祖先以来,在数亿年进化过程中发生的遗传改变逐渐积累造成的。形态改变是由遗传改变导致胚胎发育改变所致。新的机体表型能更好地适应当时的环境,具有生存优势,因而被选择保留下来。由有性生殖和遗传重组产生的遗传变异提供新的表型,成为选择作用对象。因此,基因活动的改变所引发的发育变化是多细胞生物进化的中心问题。

一、同源调节基因

Roth 于 1984 年将同源性定义为"享有受家系相关基因(genealogically - related gene)调控的共同发育途径"。在 Roth 提出有关同源性这极富影响的定义时,对发育途径的了解还知之甚少。今天,我们对发育途径已有了更深入认识,并且可以举出一些实例说明不但发育途径可以遗传,而且发育途径某些因素的变化能够导致进化发生。

(一) *Pax6*和眼发育

分子生物学和发育遗传学研究表明,在发育中起特定作用的基因在过去千百万年一直是保守的。不仅如此,这些基因及其靶标的改变可以导致产生大量的生物多样性。最明显的一个例子是 *Pax6* 基因不但调控昆虫眼睛发育,而且调控人类眼发育。

哺乳类、昆虫和软体动物眼的发育彼此各不相同。果蝇眼含有大量小眼(ommatidia),由横贯成虫盘上的形态发生沟(morphogenetic furrow)发育而来;头足类眼由同一块基板分隔成的晶体形成区和视网膜形成区发育而成;而哺乳类眼则通过一系列诱导作用,由和表面外胚层接触的间脑凸起形成。以前认为这三种类型的眼各自经独立演化而来,但均表现出趋同进化。然而,新近研究结果表明:昆虫眼和脊椎动物眼两者可能并不是由独立进化产生,而是起源于遥远的共同祖先。

人 *PAX6* 等位基因突变与眼畸形有关:杂合体明显缺乏巩膜;纯合 *PAX6* 突变体不但完全缺乏眼睛,而且出现颅面部异常。在小鼠和大鼠中,该基因的杂合体呈小眼表型而称为 *small eyes*;纯合小鼠和大鼠胎儿既无眼又无鼻,出生后很快死亡。据认为:人和小鼠的 *Pax6* 基因结构和功能相似。Quiring 等(1994)已经证明:果蝇基因组含有 *Pax6* 同源基因,其所编码的蛋白质序列和人 PAX6 蛋白具有 94% 同源性。果蝇 *Pax6* 基因功能丧失突变表明它定位于杂合体中表现为小眼而在纯合体中表现为缺眼的 *eyeless* 基因上。显然,*Pax6* 基因是昆虫和脊椎动物眼发育都必需的共同基因。

Halder 等(1995)使 *Pax6* 基因(野生型 *eyeless* 基因)在一般不表达 *Pax6* 的果蝇成虫盘中表

达。他们把编码酵母转录激活蛋白 GAL4 的基因插入到果蝇非预定神经区域如腿或翅成虫盘中能刺激基因表达的增强子下游;再把 *eyeless* cDNA 插入到组成 GAL4 五个结合位点的序列下游,构成转座子(transposon)。GAL4 蛋白只在特定成虫盘中合成;GAL4 合成后,导致特定细胞中的 *eyeless* cDNA 转录(图 21.12)。如果 *eyeless* cDNA 在果蝇触角成虫盘中表达,那么其触角就变成果蝇特有的具刚毛有色素的小眼;如果 *eyeless* cDNA 在翅成虫盘中表达,那么部分翅表皮就形成眼。如果果蝇 *eyeless* cDNA 被小鼠 *Pax6* cDNA 取代,并置于 GAL4 表达系统控制之下,那么哺乳类 Pax6 蛋白也能导致果蝇形成异位的眼(ectopic eyes)。可见,虽然脊椎动物眼和昆虫眼结构不同,但是 *Pax6* 基因既是脊椎动物眼形成的调节因子,也是昆虫眼形成的调节因子。至于进化过程中脊椎动物和昆虫眼发育途径是如何歧化的尚待进一步阐明。

图 21.12 *Pax6* cDNA 在果蝇非眼成虫盘中的定位表达

把酵母 GAL4 蛋白基因插入能刺激果蝇翅、腿或触角成虫盘中基因表达的增强子序列下游;正常情况下,不存在 GAL4 蛋白激活序列。但是,如果把在 GAL4 结合位点下游携带有 *Pax6* cDNA 的转座子加入到胚胎中,则 *Pax6* cDNA 就会在合成 GAL4 的成虫盘中表达

Pax6 在整个动物界是相当保守的,它编码的转录因子可以和眼形成基因结合。*Pax6* 基因并不是哺乳类和昆虫惟一的同源发育调节因子。含有同源框序列的 *tinman* 基因也是哺乳类和昆虫同源的发育调节因子。*tinman* 先在果蝇脏壁中胚层中表达,最终在心脏中胚层区域表达。*tinman* 功能丧失突变体缺乏心脏。在小鼠中,*tinman* 同源基因成为心脏特异性同源框(cardiac - specific homeobox, *Csx*)。*Csx* 开始也在脏壁中胚层表达,然后在形成管状心脏的细胞中表达。因此,虽然脊椎动物心脏和昆虫心脏除去都能泵血之外,基本没有共同之处,但是它们的形成都依赖于共同的 *Csx*/*tinman* 基因表达。脊椎动物和昆虫两者之间心脏出现区别必定与受 CSX/TINMAN 蛋白控制的基因有关。

(二) BMP4 和附肢形态建成

有时候,同源基因如果在新的位点表达,可能获得一种全新的功能。鸡胚附肢中 *Bmp4* 基因的表达就是一个很好的例证,说明很小的发育变化可以产生进化上明显的结构改变。鸭子和鸡虽然不同,但它们的胚胎发育直到最后几天之前都十分相似。直到发育的最后几天,鸭嘴(bill)和鸡喙(beak)才能区分出来,且鸭形成蹼足,而鸡的后肢失去蹼。

BMP4 不但能诱导颅部神经嵴、肺间充质和齿芽细胞发生凋亡(apoptosis),而且能诱导鸡附肢趾间软骨组织细胞发生凋亡。*Bmp4* 不仅在鸡附肢趾间组织内表达,而且如果鸡附肢被表达负显性 BMP 受体的病毒感染,则 BMP4 便失去诱导趾间组织细胞发生凋亡的能力。BMP 表达模式在鸭和鸡中非常相似。但是,鸭胚胎在趾间组织内并不表达 *Bmp4*(或相关的 *Bmp2*、*Bmp7*)。因此,仅仅通过对 *Bmp4* 表达作出小小的调整,就产生了一种新结构——鸭蹼足。显然,发育变化导致"最适者"出现,但"最适者"的存在则取决于环境。

（三）*Hox* 基因和脊椎动物进化

如前所述，果蝇 *Hom - C* 基因和哺乳类的 *Hox* 基因同源；不但基因本身同源，而且位于不同染色体上的基因排序也相同。再者，*Hom - C* 和 *Hox* 基因表达图式也十分相似：3′端基因在前端表达，而 5′端基因在较后端表达。Malicki 等（1992）证明：人 *HOX4B* 基因导入果蝇 *Deformed*（*Dfd*）缺陷型胚胎后，可以模拟果蝇同源基因 *Dfd* 的功能。据推测，*Hox* 基因表达图式在整个动物门类中是恒定的，*labial* 类型 *Hox* 基因在前端表达，*Ubx* 类型 *Hox* 基因在中部表达，而 *AbdB* 类型 *Hox* 在后端表达；*Hox* 基因的表达图式规定了所有动物发育的区域界限。*Hox* 基因的总体调控作用在不同动物中也极为相似：Caudal 蛋白不但用于诱导形成果蝇后端区域，而且在小鼠和线虫中同样用于诱导形成后端区域。如果说不同门类动物中 *Hox* 基因表达的基本图式是一致的，那么可以认为：不同门类动物的区别是由 *Hox* 基因调控差异以及 *Hox* 基因衍生蛋白调控的基因差异造成的。

在脊椎动物中，存在 4 个 *Hox* 基因复合体。在原索动物文昌鱼中，只存在一种 *Hox* 复合体，它看起来和昆虫的 *Hom - C* 基因复合体很相似（图 21.13）。当进化形成鱼类时，出现了 4 个 *Hox* 基因复合体。*Hox* 基因代表沿前后体轴的位置信息，这些基因在进化和发育中的重要性可以由失去特定 *Hox* 基因而形成的返祖结构（atavistic structure）看出来。破坏 *Hoxa - 2* 基因导致第 2 对鳃弓部分转变成第 1 对鳃弓：突变胎儿缺乏由第 2 对鳃弓形成的镫骨和柱骨，而产生多余的锤骨、砧骨、鼓骨和鳞骨。突变胎儿还具有杆状软骨，和翼蝶骨融合，其尾端与多余的砧骨相连。这种杆状软骨在正常小鼠中是不存在的，其解剖学特征说明它和爬行类的翼状方软骨（pterygoquadrate cartilage）同源。据认为，翼状方软骨和砧骨构成的复合体存在与兽孔目爬行动物（therapsids）即演化成哺乳类的爬行动物中。如果剔除视黄酸受体引起 *Hoxa - 2* 基因调控紊乱，就能发育出独特的翼状方软骨，把砧骨和翼蝶骨连接起来。

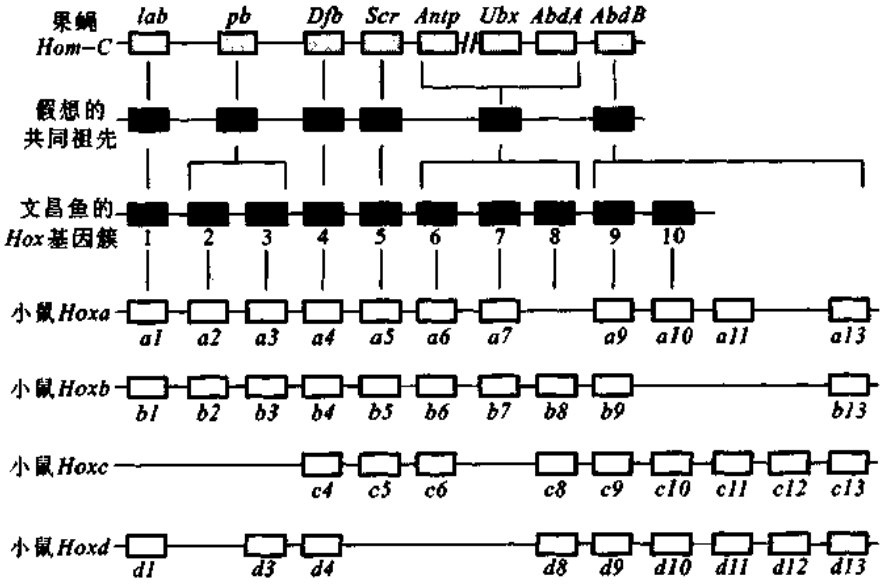


图 21.13　原口动物和后口动物假想祖先的同源框基因

文昌鱼只有一个 *Hox* 基因簇，和昆虫相似。脊椎动物具有 4 个 *Hox* 基因簇，但没有一个是完整的

Hox 基因究竟是根据计数系统(counting system)还是通过密码系统(code system)来决定脊椎动物轴性的,目前尚不清楚。这是一个有待解决的十分重要的问题,因为它将说明同样的 *Hox* 基因如何决定不同的形体模式。把 *Hox* 基因表达图式和不同类型脊椎动物比较,可以看出脊椎动物类型是由 *Hox* 在体节中的表达格局(constellation)决定的。例如,小鼠有 5 块枕骨、7 块颈椎骨、13 块胸椎骨、6 块腰椎骨和 4 块骶椎骨,而鸡有 5 块枕骨、14 块颈椎骨、7 块胸椎骨、9 块腰椎骨和 4 块骶椎骨。虽然两者骶椎骨之前的脊椎骨数目只相差 1 块(34:35),但是两者之间存在明显过渡。在小鼠和鸡中,*Hoxc - 5* 只在颈椎后端表达,而 *Hoxc - 6* 则在胸椎起点处表达。*Hoxc - 5* 和 *Hoxc - 6* 基因在小鼠的第 12 和第 13 脊椎分界处表达,而在鸡的第 19 和第 20 脊椎分界处表达。因此,在脊椎动物中,形态学变化可以由 *Hox* 基因表达区域的变化而产生。

二、发育的同源途径

过去 10 多年中,发育生物学中最激动人心的发现除同源调节基因之外,还有同源发育途径(homologous developmental pathway)。目前,已发现存在 chordin/BMP4、Hedgehog/Wingless 和 RTK - Ras 信号转导 3 条同源发育途径。chordin/BMP4 途径表明:不但在脊椎动物而且在无脊椎动物中,chordin/short - gastrulation 蛋白都能抑制 BMP4/decapentaplegic 蛋白的偏侧效应(lateralizing effect),使受 chordin/short - gastrulation 保护的外胚层变成神经外胚层。果蝇的 decapentaplegic 和非洲爪蟾的 short - gastrulation 作用是如此相似,以至于 decapentaplegic 能替代 short - gastrulation 在非洲爪蟾中诱导形成腹部。

在昆虫和脊椎动物附肢形成中都保留着第二条同源发育途径,即 Hedgehog 和 Wingless 蛋白之间的相互作用。果蝇早期胚胎分节图式的建立和哺乳类脑部分区的建立都利用 Hedgehog 和 Wingless 之间的相互作用。此外,不同动物中还保留着大量调控特定基因的 DNA - 蛋白质相互作用。例如,果蝇脂肪体中的乙醇脱氢酶基因同样受人类肝脏中调控乙醇脱氢酶基因表达的同一组蛋白的控制。

新近发现的第三条同源发育途径即受体酪氨酸激酶 - 核苷酸结合蛋白 Ras(receptor tyrosine kinase - nucleotide binding protein Ras,RTK - Ras)信号转导途径也存在于整个动物界。在果蝇中,当 sevenless 蛋白(在预定光感受器 7 上)与光感受器 8 上的 Boss 蛋白结合时,光感受器 7 激活 sevenless 蛋白的酪氨酸激酶,使 sevenless 蛋白磷酸化。然后,DRK 蛋白通过 SH2(Src - homology - 2)区域和刚刚磷酸化的酪氨酸结合,激活 sevenless 蛋白之"子"——SOS 蛋白。SOS 蛋白是鸟嘌呤核苷酸"交换器",可以把 Ras 1 蛋白上的 GDP 转换成 GTP。这一交换作用将 G 蛋白激活,G 蛋白将它的激活信号通过有丝分裂关联蛋白(mitosis - associated protein,MAP)激酶级联反应传递给细胞核。在线虫阴门、哺乳类表皮和果蝇终端分节的决定作用中,都存在上述同样的 RTK - Ras 作用系统。不同动物之间 RTK - Ras 作用系统十分相似,许多组分可以在不同动物之间彼此交换。例如:人 *GRB2* 基因可以修正 *Sem - 5* 缺陷型线虫的表型缺陷;而线虫 SEM - 5 蛋白可以和人 EGF 受体的磷酸化形式结合。

同源发育途径构成发育的基本结构。不同有机体中,同源发育途径的靶标能够变化。在一种有机体中,RTK - Ras 途径可以激活细胞分裂基因;在另一种有机体中,同一途径又能激活形成光感受器的基因;而在第三种有机体中,同样的途径则激活形成阴门的基因。

第七节　新型细胞的形成

进化和发育生物学一个最大的未解之谜是：有机体是如何进化出新的细胞类型的？这是进化和发育生物学的一个重要问题，因为动物门类的变化都是和新型细胞的出现相联系的。曾经有人假设基因新组合能够产生新型细胞，但是目前还缺乏实验证据。Kauffman(1993)用数学模型证明：每一个随机的由 10 000 个基因组成的基因组可以产生一个新型细胞；每个新型细胞都受 2 个不同的基因调控。

新型细胞的产生是自然界罕见的事件，新型细胞的产生常常能改变动物的本性。如图 21.14 所示，脊椎动物可能就是通过几个步骤由无脊椎动物演化而来，而每一个步骤都与新型细胞的形成和重塑有关。

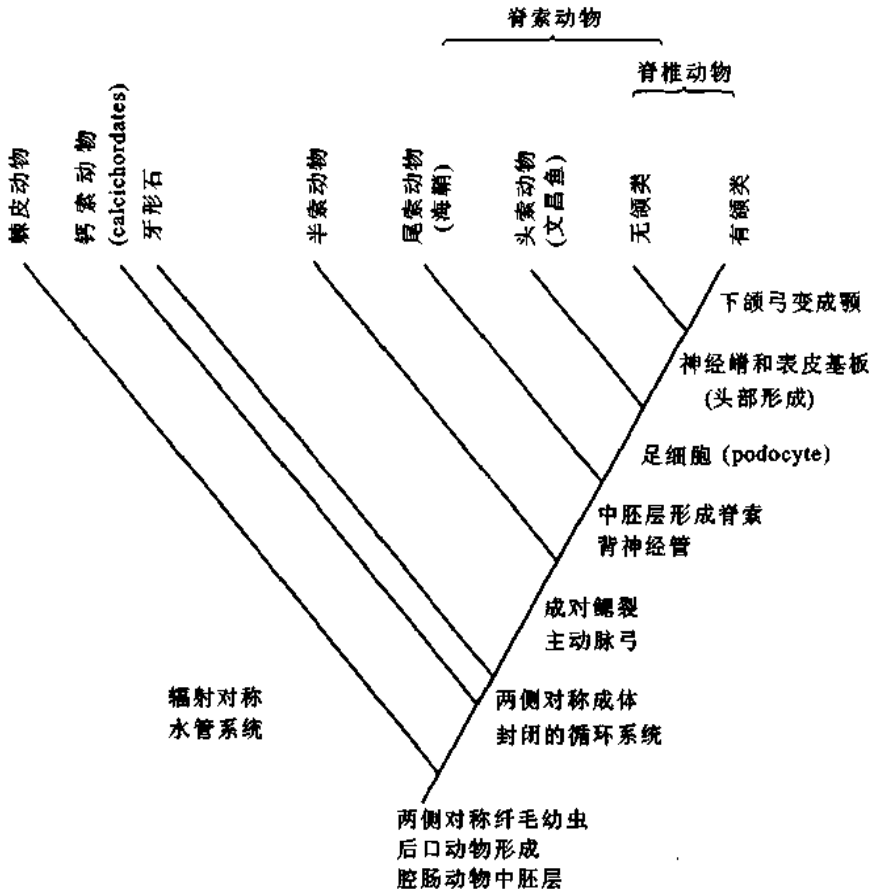


图 21.14　由无脊椎动物进化到脊椎动物的发育变化

最初的后口类无脊椎动物形成棘皮动物和其他有机体，最终形成脊椎动物世系。中胚层形成脊索及其诱导上面外胚层形成神经管的能力把脊索动物和无脊椎动物分开。神经嵴细胞的发育以及形成面部感觉神经的表皮基板又把脊椎动物和原索动物分开

前面已讲过，神经嵴细胞在脊椎动物起源中起重要作用。文昌鱼为原索动物，具有脊索、体节和背神经管，但缺乏脑和面部结构，更为重要的是缺乏神经嵴细胞。和果蝇一样，文昌鱼单倍体中只含有一个 *Distal - less* 基因拷贝，它只在表皮和中枢神经系统中表达。相比之下，脊椎动物具有5～6个紧密相关的 *Distal - less* 基因拷贝，其中每个 *Distal - less* 基因可能都起源于和文昌鱼 *Distal - less* 基因相似的单个祖先基因。脊椎动物这些 *Distal - less* 同源基因已经形成一些新功能：其中一些在脊椎动物中胚层表达，而在文昌鱼中胚层中是不表达的；另一些 *Distal - less* 同源基因在脊椎动物前脑中表达，这和在文昌鱼神经管前端表达图式相似。此外，脊椎动物另一个 *Distal - less* 同源基因在神经嵴中表达。很可能 *Distal - less* 新型基因引起文昌鱼迁移性外胚层细胞进化形成神经嵴细胞。

第八节 进化发育生物学

我国学者王亚辉等(1998)对遗传、发育和进化的统一关系作了深入精辟的评述，并认为21世纪将"最终在分子水平实现遗传、发育和进化的理论大综合"。其实，在达尔文时代，发育和进化曾是彼此联系的统一体。但是从19世纪末开始，发育生物学和进化生物学彼此分离。Roux 于1894年发表的用热针烫死蛙胚部分分裂球的方法研究发育机制的文章，开创了用实验手段研究胚胎发育的新时代。也正是在这个时期，在世界上一些著名的海滨圣地，如意大利那不勒斯和美国伍兹霍尔等地，先后建起了海洋生物实验站，吸引了一大批著名胚胎学家如 E. G. Conklin 和 E. B. Wilson 等来实验站从事研究工作，探索各种海洋动物胚胎的细胞谱系以及细胞发育命运。对细胞谱系的研究开始是描述性的，但是，对细胞谱系的描述不可避免地涉及到有关细胞的终极命运。于是，很自然地导致胚胎学家用实验方法研究其发育命运，比如可以通过去除分裂球的方法研究所去除分裂球在胚胎发育中的作用。从20世纪初开始，胚胎学家对胚胎如何发育比对胚胎如何进化更感兴趣，因而对胚胎发育本身进行了大量实验研究，而对系统发育的研究则逐渐失去了兴趣。

个体发育不但是对发育机制选择的产物，而且是特定进化历史的产物。各门动物都具有区别于其他门动物的特有的解剖学特征，这些特有的解剖学结构内在的排列称为形体模式。脊椎动物、节肢动物和棘皮动物都具有各自明显独特的形体模式。各门动物特有的形体模式的产生是由在长期进化过程中发生的形式变化积累形成的，或者说个体发育过程蕴含着系统发育过程中长期积累形成的形式变化。要理解发育和进化之间的关系，需要将传统上分开的两个学科——发育生物学和进化生物学综合起来。

过去几年中，在基因概念具体化(双螺旋结构和X－光衍射技术)的基础上，基因克隆和序列测定资料不断增加，使得在发育中起重要作用的基因逐渐得到深入研究。不同的基因序列不但可以从进化角度比较，从而找出同源基因，而且可以研究同源基因在发育中的作用。这样一来，发育生物学和进化生物学在彼此分离将近一个世纪之后，又在基因水平上再度汇合。今天，发育生物学家必须认真对待多样性和比较方法，认识到系统发育的重要性；而进化生物学家必须理解并将发育系统的内在规律纳入到进化理论之中。

综上所述，发育生物学和进化生物学在分子水平上又再度联合在一起了，并产生了进化发育生物学(evolutionary developmental biology)这门新学科。进化发育生物学产生的基础是基因序列测

定手段的成熟以及基因序列测定资料的大量积累。如今，发育生物学家不能忽视进化问题，进化生物学家也不能忽视发育问题，而分子遗传学为发育生物学家理解进化以及进化生物学家理解发育奠定了基础。

参考文献

1 李喜先等．21世纪个科学难题．长春：吉林人民出版社，1998.293～400

2 张士璀．进化发育生物学——发育、进化和遗传的再联合．生命科学，2000，12：145～147

3 Bateson W. Materials for the Study of Variation. Cambridge: Cambridge University Press, 1894

4 Buss L W. The Evolution of Individuality. Princeton: Princeton University Press, 1987

5 Dyke C. The Evolutionary Dynamics of Complex Systems. NY: Oxford University Press, 1988

6 Halder G, *et al*. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. Science, 1995, 167: 1 788～1 792

7 Hall B K. Evolutionary Developmental Biology. London: Chapman and Hall, 1992

8 Henry J J, *et al*. Early inductive interactions are involved in restricting cell fates of mesomeres in sea urchin embryos. Dev. Biol., 1989, 136: 140～153

9 Hofmann A, Glabe C. Bindin. A multifunctional sperm ligand and the evolution of new species. Semin. Dev. Biol., 1994, 5: 233～242

10 Holder N. Developmental constraints and the evolution of vertebrate limb patterns. J. Theor. Biol., 1983, 104: 451～471

11 Kauffman S A. Origins of Order. NY: Oxford University Press, 1993

12 Lillie F R. Adaptation in cleavage. In: Biological Lectures from the Marine Biological Laboratories, Woods Hole, Msssachusetts. Boston: Ginn, 1898, 43～67

13 Malicki J, *et al*. Human HOX4B regulatory element provides head-specific expression in *Drosophila* embryos. Nature, 1992, 358: 345～347

14 Oster G F, *et al*. Evolution and morphogenetic rules: The shape of the vertebrate limb in ontogeny and phylogeny. Evolution, 1988, 42: 862～884

15 Quiring R, *et al*. Homology of the eye-less gene of *Drosophila* to the small eye gene of mice and *Aniridia* in humans. Science, 1994, 265: 785～789

16 Raff R A. The Shape of Life: Genes, Development, and the Evoolution of Animal Form. Chicago: University of Chiacago Press, 1996

17 Raff R A, *et al*. Implications of radical evolutionary changes in early development for concepts of developmental constraint. In: Warren L, Meselson M. New Perspectives in Evolution. New York: Liss-Wiley, 1991

18 Waddington C H. The morphogenetic function of a vestigial organ in the chick. J. Exp. Biol., 1938, 15: 371～376

19 Wagner G P. Homologues, natural kinds, and the evolution of modularity. Amer. Zool., 1996, 36: 36～43

20 Wilson E B. Cell lineage and ancestral reminiscence. In: Biological Lectures from the Marine Biological Laboratories, Woods Hole, Massachusetts. Boston: Ginn, 1898, 21～42

第六篇

植物发育

第二十二章　植物的营养生长

第一节　植物发育生物学概论

一、植物发育生物学的概念

植物发育生物学(plant developmental biology)是研究植物生长发育及其遗传控制的学科，即研究个体发生及发育的学科。这是一门用现代生物学方法研究植物胚胎发育和分化及器官进一步发育的学科。高等植物的细胞和胚胎分化相对动物要简单得多，而且成熟植物器官是在植物成长过程中逐渐长成的。

二、植物与动物发育机制的区别

植物王国十分庞大，从低等的单细胞藻类，到多细胞的陆生植物，其形状千差万别。植物和动物最早的共同祖先是单细胞的真核生物，而它们的进化过程可能在多细胞体中就分道扬镳了。它们的细胞在内部特征和基本生物化学过程上都有很多共同点，但是在发育上植物与动物却有着很大的差别。高等植物的发育有其自身一系列的特点。

首先，植物的生长发育是一个开放系统，由种子萌发形成幼苗，在其生活史的各个阶段不断形成新的器官。植物细胞外面包被着相对坚硬的细胞壁。在植物体中没有细胞的迁移，植物发育时形状的变化也不像动物那样在早期胚胎发生过程中有细胞层的移动和内卷。在植物发育中，细胞分裂速度的不同和由于细胞的直接增大产生的不同层面形成了外部形态的变化。而动物在胚胎发育阶段已基本完成了器官的分化过程。动物发育的大部分在受精和出生之间发生，称之为胚胎发生。实际上动物发育学几乎等同于胚胎学。当然，动物在出生后仍继续发育。从出生到成年，随着年龄的增长，发育也迟缓起来，但是相对于从受精卵形成一个具有各种功能的多细胞生命体来说，出生后的发育及变化是相当小的。虽然出生后器官仍然会持续发育，但从一出生，这些器官就是可见的，同时已具备了功能或部分功能。种子植物虽然也经历胚胎发生，同时种子包含一个胚状植物体(embryonic plant)，然而，这个胚状植物体缺乏成熟植物的大部分器官和组织系统。成熟植物的组织和器官不是在胚胎中发育，而是在种子发芽后通过分生组织的活动形成。植物发育的显著特征之一是它的持续性，可以认为植物的个体发育是分生组织通过不断改变本身的属性而完成的。

第二，高等植物胚生长后期，在特定的区域产生了分生组织，由它产生植物体的“成熟”结构——根、茎、叶和花。植物分生组织的细胞具有像动物干细胞一样的以相同方式重复分裂的能力，由这些细胞形成各种组织。在胚中形成两群分生组织，一群在根尖，一群在苗端，成年植物体中几

乎所有的分生组织都是来自它们。由于这种生长模式，植物器官的发育不是仅在胚中发生，而是通过分生组织贯穿于植物的一生。植物由营养生长转向生殖发育是植物生长到一定阶段后才完成的，对于多数植物这一过程受到光、温等外界环境因子的调控。

第三，植物细胞在一定外界条件刺激下（包括离体培养）表现出高度的细胞全能性，即一个完整的、可育的植物体可从单个体细胞发育而来，而无须经过受精卵。这说明，与成体动物已分化的细胞不同，成体植物的某些已分化细胞尚保留全能性（totipotency）。可能在某种意义上它们尚未完全成为成体细胞，或者可能它们能够从已确定的阶段脱离出来，但是这两者是如何成功的尚不清楚。

第四，植物发育过程中有世代交替现象。植物在一个完整的生活史（合子—合子）过程中，产生两种不同性质的植物体，即孢子体和配子体。二倍体的合子发育成二倍体的孢子体。通过无性生殖产生单倍体的孢子，孢子发育产生单倍体的配子体。配子体进行有性生殖产生合子。

最后，由于植物的根固着于土壤中而使之不能像动物一样随意移动，这又决定了植物必须对环境条件的变化作出多种反应，以利于其生长发育过程的完成。植物界的生物多样性不仅表现在物种之间的千差万别，而且由于植物生长发育环境的不同，即使是同一物种其形态也可以相差极大。

虽然动植物的发育过程有许多差异，但遗传分析表明，植物和动物的发育样式具有十分相似的遗传对策。

植物发育中的一个难题就是细胞的命运是如何确定的。植物许多结构的发育是由细胞分裂的特定方式决定的，但是目前还不清楚的是细胞分裂方式对细胞的性质和它以后的分化的影响有多大，是内部因素影响细胞分裂，还是细胞之间的相互作用更重要。一个细胞的命运是随着它在分生组织中位置的变化而变更，这意味着从其他细胞发出的信息是起作用的。对于植物细胞彼此之间如何进行通讯及传导激素和信息的了解要远少于对动物细胞的认识。细胞壁可以认为是对大分子（如蛋白质）通过设置的障碍，但是所有已知的植物生长激素都是小分子，如生长素、赤霉素、细胞分裂素及乙烯等，它们都很容易穿透细胞壁。植物细胞彼此之间的通讯还可以通过胞间连丝进行。胞间连丝是穿过细胞壁连接相邻细胞的细小的细胞质通道，有证据表明蛋白质和 RNA 可以通过胞间连丝在植物细胞之间迁移。

三、植物分子生物学研究中的模式植物——拟南芥

拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）是典型的十字花科植物，虽然没有任何经济价值，但由于具有一些独特的生物学、遗传学及分子生物学性质而成为当今植物分子生物学研究中的模式植物。

拟南芥植株很小，成熟个体只有约 15 cm 高。因此可以大批量在温室中生长（根据需要，也可以在培养器皿中生长），生长条件十分易于控制，这样在筛选遗传变异株时可以很容易地排除那些由于环境变化导致的植物形态发育的变化。拟南芥同时是一种典型的自交繁殖植物，因此人工诱变后可以在子二代中直接筛选变异株的纯合子。根据遗传分析的需要，其人工杂交也很容易完成。另外，一株拟南芥可以产生上万粒种子，因此很容易扩增变异株的种子库 。拟南芥的生长期很短，下种后 2～3 天就开始萌发，20 天左右植株就开始开花结果，40 天左右第一个种荚中的种子就已成熟并可收获，由此大大缩短了遗传分析的时间。相比之下，小麦、玉米、豌豆等的生长期一般需几个月，使得遗传分析进展非常缓慢。此外，对于拟南芥的形态发生和个体发育过程也已有详尽的描述，从而为寻找和确定形态变异株打下了基础。利用拟南芥的另一长处就是很容易对其人工诱导产生遗传变异。通过物理的（如辐射处理）、化学的（如 EMS 处理）及生物的（如利用植物内源激素

转座子或外源 DNA 片段插入法)等手段进行人工诱变处理,至今已获得大量发生在不同基因位点的遗传变异株。

拟南芥单体有 5 条染色单体,2000 年 12 月已绘出全部染色单体上的基因图谱。在目前已知基因组大小的高等植物中,拟南芥的核基因组最小,其单倍体基因组只有 80 000 kb 左右。基因组小,基因库的构建、筛选等过程简便、快速。基因组小,基因组中具高度重复、中度重复及低度重复 DNA 的比例低。高度重复序列只占 10%～15%,中度重复序列只占 7.5%左右,间隙重复序列(低度重复序列)只占 1%左右,而余下的 80 %基本上是用来构建单拷贝基因的。所以在人工诱变拟南芥种子后,可以获得大量形态各异的涉及植物发育各个过程的变异株。这些变异株为研究各基因在植物发育中的功能及其调控提供了良好的材料。

第二节　植物的早期发育

因为植物自苔藓植物开始才有胚出现,因此对于植物(包括属于无胚植物的低等藻类和菌类植物在内)的早期发育统称为早期形态发生为宜,而胚胎发育则应特指有胚植物的最早期发育。

一、合子的极性和不对称细胞分裂

植物受精卵同动物合子一样以同样方式,经过细胞的重复分裂、细胞生长和分化形成多细胞胚(或植物体)。不同类型植物早期细胞分裂的方式是多种多样的,但是从发育对策上来讲,这些方式变化的意义还不清楚。即使如此,早期细胞分裂的共同方式是指合子的首次分裂。在许多种中,首次分裂是不均等的,目前还不了解这种不均等细胞分裂对其后来具有不同特征的子细胞在发育上的影响范围有多大。

让我们从多细胞藻类的形态发生过程来看不均等细胞分裂的重要性。在墨角藻属(*Fucus*)中,当合子还是单细胞时,体轴的顶端和基部是由环境信号决定的。体轴的确定导致合子沿轴横向不均等分裂。从而勾绘出藻体的两个主要区域。墨角藻的研究表明细胞壁是发育信号的重要潜在来源。

墨角藻的卵细胞进行体外受精,合子随水漂流直到遇到适宜固着生长的表面为止,一旦固着,发育就开始。在第一次分裂,合子分裂为两个大小不同的细胞,较小的一个长成根状假根,另一个长成为叶状原植体,即藻体的叶状部分(图 22.1)。这种不均等细胞分裂产生顶端—基部,而极性在合子开始分裂之前就已经存在了。在许多高等植物的合子分裂中,同样的不均等横裂也指示出了顶端—基部极性的方向。墨角藻合子中的第一个不均等信号是在第一次分裂之前,未来的假根部分开始突出。合子最初是对称的,并且实验证明,后来的极性是由环境信号所决定的。

有很多环境的刺激,包括光照,pH 梯度以及水流等,都能决定极性(在缺少这种信号刺激时,决定极性的内部机制是精子的进入点,它影响未来的假根区域)。可以用实验来生动演示光的效应:将一些墨角藻的合子放入一个细毛细管中,避免其转动,然后自管的一端照光,其结果所有假根都从卵的背光面长出,而与精子进入的位置无关。

卵的极性与发育时沿轴向流动的电流有关(图 22.2)。部分电流是由钙离子携带的,即局部的钙离子导体引发细胞内的局部钙离子流,它导致这部位假根的生长。所有的环境信号能够起作用

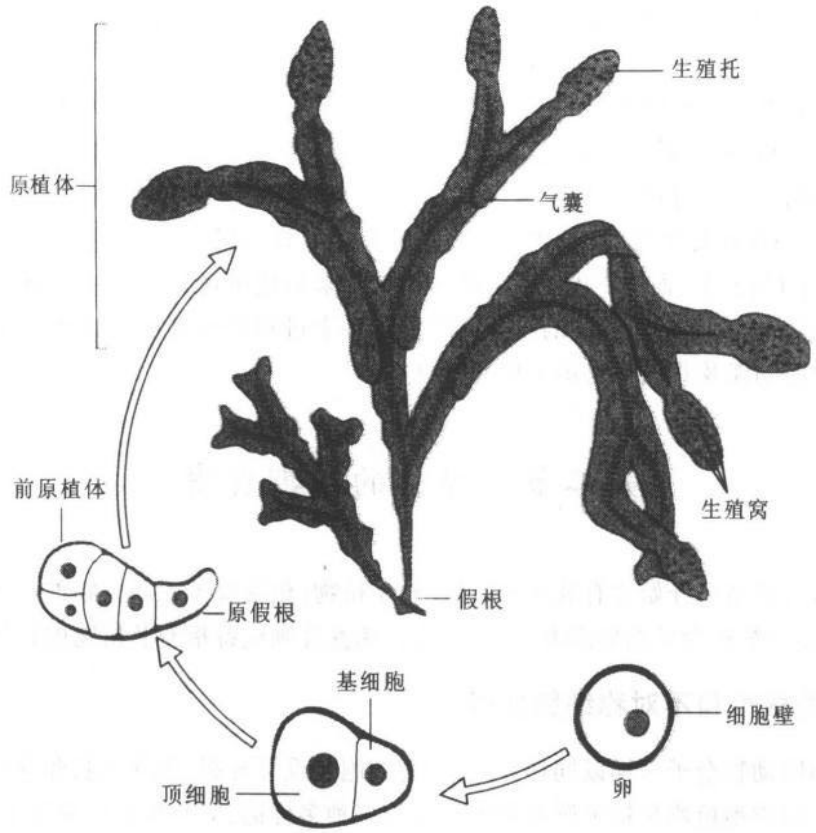


图 22.1　多细胞褐藻墨角藻(*Fucus spiralis*)的生活史

藻体由前端分叉的扁平叶状体组成,它藉假根固着在岩石或其他坚硬的基质上。在叶状体前端发生膨大的生殖托,其上生有凹陷的充满胶质的生殖窝。雌雄配子分别在不同的生殖托上产生。配子成熟后离开生殖窝,卵在体外与游动精子受精。合子随水漂流,直至固着在适合的基质上开始发育。合子的第一次分裂是不均等的,产生一个较小的基细胞,由其长成假根,而另一较大的顶细胞则发育为叶状原植体

使局部钙通道开通,致使引发更多钙通道的电流聚集在一端,而钙泵位于轴的另一端,它们把钙离子泵出细胞外。这种正反馈机制维持着电流方向。离子流影响卵的内部成分,使它们局限分布在钙离子进入细胞的那个区域。

尽管轴是由离子流确定,但是其他过程对轴的固定也是必需的。在受精 12 h 后轴才能完全确定下来,在受精后 7 h 之内,轴的位置是能够变更的。细胞内的成分迁移至和积累到假根形成处的细胞质中;特殊的多糖迁移到假根处,加入到假根的细胞壁中去。似乎细胞骨架和细胞壁都与轴的确定有关。肌动蛋白微丝分布在假根处。外加细胞松弛素 B,能分解假根处的肌动蛋白丝并阻止轴的形成。用酶处理除去细胞壁也能阻止形成轴。由此提出了一个关于卵极性化的假说:钙离子流在未来假根区确定肌动蛋白网,并由此开始一系列导致多糖加入细胞壁的活动。

墨角藻早期分裂的方式与某些高等植物的胚相似。因为墨角藻的早期细胞很容易进行显微手术操作,由此能了解决定早期细胞命运的机制。特别是从顶细胞到叶状体和从基细胞到假根的发育,这些区域中细胞的分裂方式是不同的。假定的假根和叶状体两者的命运在 2 - 细胞阶段可以通过实验手段而加以改变。如果用细激光束破坏基细胞的壁,未来的假根细胞就被挤出呈球状原

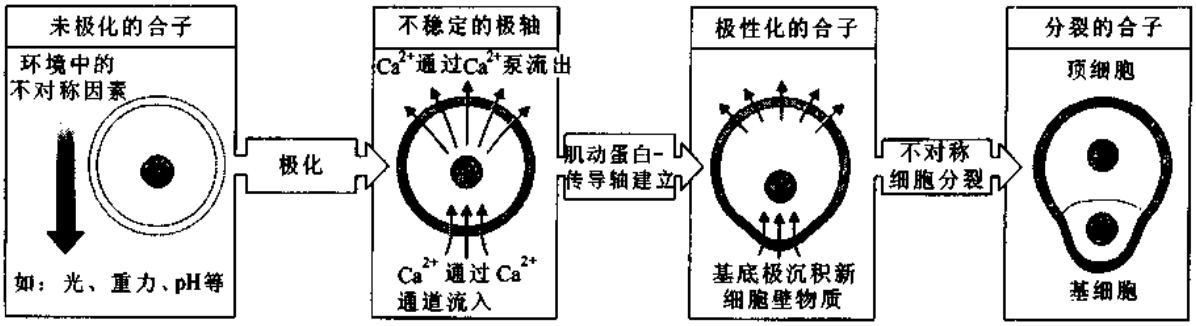


图 22.2　墨角藻(*Fucus*)合子的极性化

合子最初是无极性的。在合子发育中会遇到各种不对称的环境因素，比如单侧光照、重力或 pH 梯度。这些因素使合子产生极性。通过合子的部分电流是由钙离子携带的。环境影响加快钙离子由细胞一端流入，同时也从相对的一端加快流出。在直射光照条件下，背光面是钙离子流入增加的位置，从而成为合子的基部极，将来形成假根。由于细胞液泡、线粒体和高尔基体积累在钙流入的一端，使顶端—基部轴固定下来。细胞壁物质沉积在这端，并且肌动蛋白丝也分布在此。垂直顶端—基部轴细胞进行第一分裂，并且是不均等的，产生一个较小的基细胞和一个较大的顶细胞

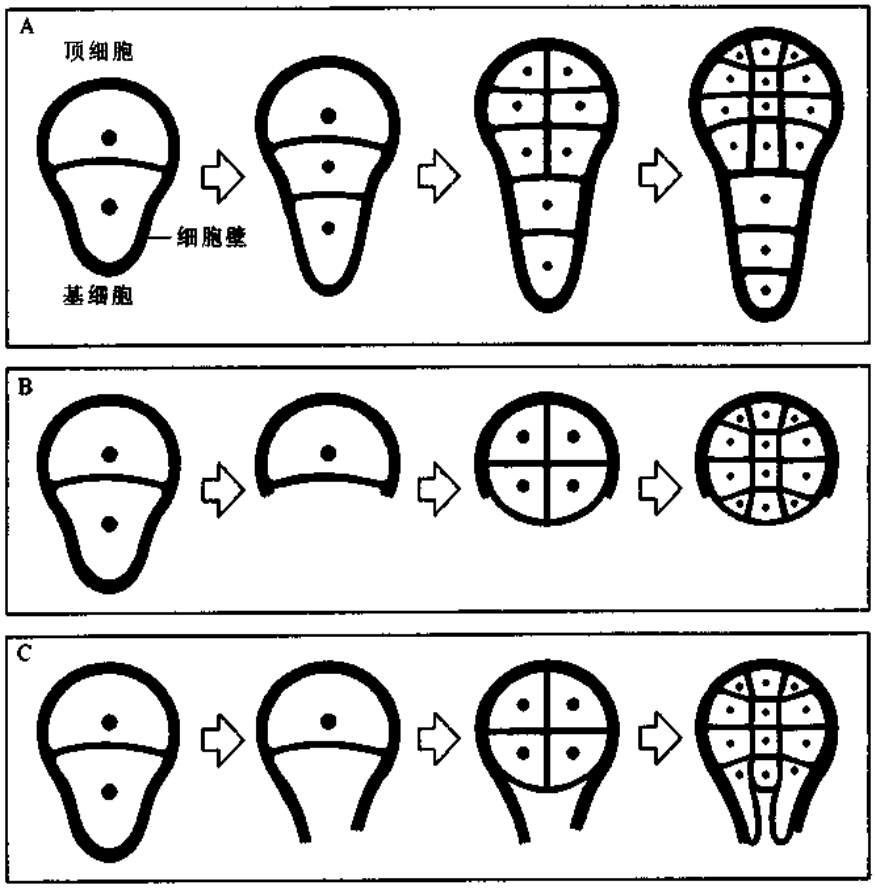


图 22.3　墨角藻(*Fucus*)细胞壁决定细胞的命运

A. 正常的发育状态　B. 在 2－细胞期阶段将顶细胞分离出来，分离的顶细胞仅发育出原植体细胞　C. 分离的顶细胞还残留着部分基细胞的细胞壁。除了进行产生原植体的细胞分裂，与基细胞残壁接触部分还产生了类似假根的结构

生质体。1 h 内,这个孤立的原生质体就会长出细胞壁,然后发育成为一个完整的细胞团,能够分化出假根和叶状体。这十分清楚地表明,基细胞的命运在这阶段是不确定的,是能够转变的。这也暗示细胞壁成分可能与基细胞未来发育的方向有关。

有关细胞壁与引导细胞命运的作用的许多证据来自对顶细胞的实验(图 22.3)。一个从 2 细胞团中分离出来的带有完整细胞壁的顶细胞至少到 8 - 细胞期阶段是继续按正常的叶状体方式进行分裂。如果分离时带上一部分基细胞的壁,与基细胞壁接触的叶状体细胞则发育成假根细胞,而其余细胞还是发育成叶状体,所以假根细胞的发育取决于基细胞的接触与否。这一有力的证据表明,墨角藻早期的 2 细胞团的位置决定分化的机制可能与细胞壁内表面上的因子相关。

二、植物的早期胚胎发育

不同种的被子植物胚中细胞分裂的方式是多种多样的。与墨角藻一样,最普遍的方式是,第一次分裂是相对于合子长轴的横裂,并且将合子分成为顶细胞和基细胞。在某些植物胚中,基细胞对于胚的继续发育用处不大,它长成可能只有几个细胞的胚柄。在被子植物中,如荠菜(*Capcella bursapastoris*)和拟南芥属(*Arabidopsis*),顶细胞进行复杂的分裂过程,在大约 5 天内形成球形胚阶段,然后达到心形胚阶段(图 22.4)。

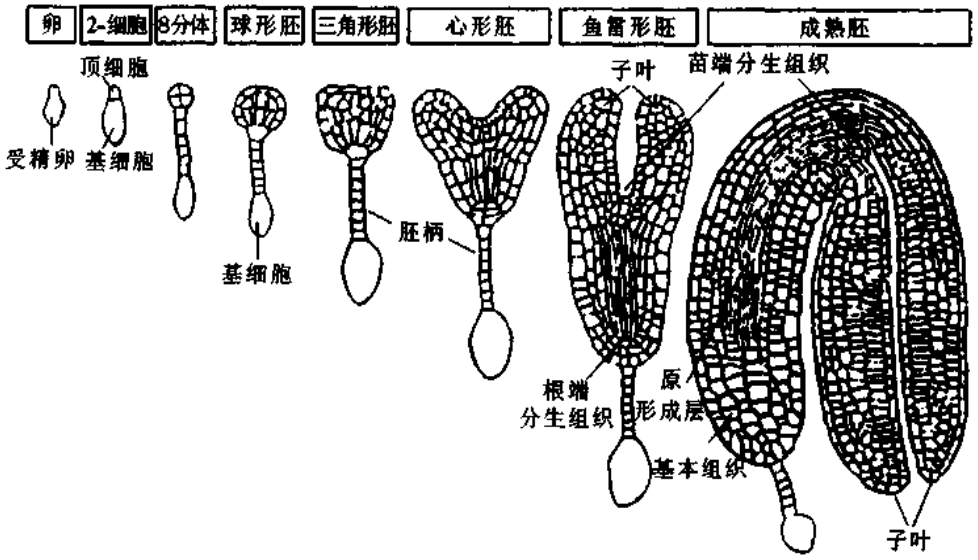


图 22.4 荠菜的胚胎发育简图

根据细胞分裂方式以及随后胚性细胞的命运和它们生成什么区域,已建立起了拟南芥属的最早期胚的粗略发育图谱。当顶端头上为 8 个细胞时,即 8 分体阶段,就可开始描绘未来心形胚阶段的主要部位,在心形胚阶段发育的途径都可以清晰地勾画出来。心形胚阶段的胚可以分成三个主要的区域:① 顶端区,由此生成苗端分生组织和子叶;② 中央区,将形成下胚轴;③ 基部区,生成根分生组织。在径向面上有由表皮、基本组织(皮层和内皮层)及微管组织等形成的同心环。然而,尚不清楚这一阶段细胞命运的确定是从何时开始的,也就是说,是否它们的命运事实上在最早的不均等分裂后就决定了。克隆分析表明,细胞的发育有很大的变异性,因此确定细胞发育的来源是不困

难的。*FASS* 基因的突变会全盘变更细胞分裂的方式和瓦解细胞，尽管由此产生的籽苗是畸形的，但它还是在正常的部位长出根、苗和花。

对有花植物的胚进行显微操作是很不容易的，但是它们的发育进程却可藉突变来改变。突变对拟南芥早期植物体发育进程的影响在心形胚阶段就能识别出来。在拟南芥中发现，合子基因的突变影响顶端—基部各不同部位的发育途径。在顶端突变体中，子叶和苗端分生组织缺失；在中央突变体中没有下胚轴，子叶直接与根相接；在基部突变体中缺少下胚轴和根(图 22.5)。

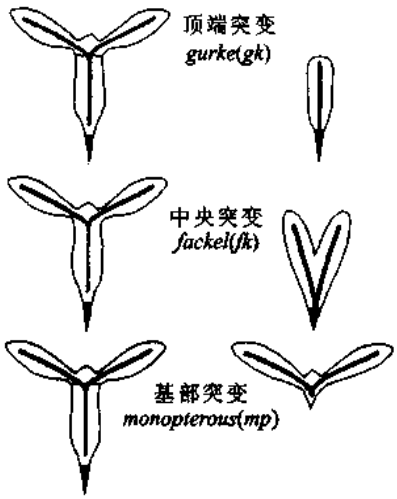


图 22.5　拟南芥胚中沿顶端－基部轴部分器官缺失的突变
已发现的 3 种主要突变体——顶端、中央和基部突变型。左边为野生型籽苗，右边为突变型

这些突变的表型说明胚的顶端—基部轴上特定区域发育途径的改变是受特殊基因的控制的。控制的机制尚不明了，但与此有关的基因已被证实：基部突变体 *monopterous* 缺失下胚轴和根分生组织，在 8 分体的中央和基部区域可观察到不正常的细胞分裂；*fackel* 突变体影响中央部分；*gurke* 突变是顶端突变，导致苗端分生组织和子叶缺失；*SHOOT MERISTEMLESS* 基因突变完全阻断苗端顶端分生组织形成，而对根分生组织或胚的其他部分则无影响。

径向发育在 8－细胞期阶段开始，并与细胞分裂方向有关。平周分裂增添新的组织层。垂周分裂则增加层中细胞的数目。组织的命运在发育的早期就确定下来，但也与遗传有关，因为在 *keule* 突变体的胚中，早期阶段的表皮细胞就开始膨大，然而在 *short root* 突变体中则缺少内皮层。

已对影响拟南芥胚发育途径的其他突变体进行了观察。如具 *LEAFY COTYLENON* 基因的突变体能产生子叶变成叶片的同源异型转化。这个转化的特征是：通常仅在叶和茎上发现的毛现在出现在子叶上；子叶的微管组织的复杂程度介于子叶和叶片之间。

各种不同的突变体影响胚和幼苗的形状。例如，*fass* 突变体，细胞分裂无序，引起肥胖和矮苗，其中的细胞多为圆形，并且无规律排列，不像野生型胚中是长形细胞有序的排列。尽管 *fass* 的幼苗是匍匐的，但因为有增大的微管系统和加厚的皮层，所以基本的径向发育途径还是正常的。这表明初始的胚胎发育途径不取决于细胞的形状和大小，而是取决于细胞的相对位置。

三、体细胞胚的发生

许多植物体细胞保留全能性。来自根、茎和叶的体细胞，甚至某些种的一个单独分离的原生质体，在培养条件下通过生长激素的诱导能长成一个新植株。仔细观察培养的植物细胞增殖，可发现一些分离的细胞通过与正常胚胎发育十分相似的过程长成细胞团(称为胚状体)，虽然细胞分裂的方式与胚的分裂方式不完全相同，但它仍能发育成幼苗。许多植物都能以这种方法从单细胞发育到胚状体到植株。单个体细胞长成完整植株的能力对植物发育有两个重要的意义：首先，植物体胚胎发生中母体的决定作用很小或不重要，每个体细胞不一定都携带这种决定因子；其次，表明成年植物体中的多数细胞并没有完全确定它们的命运，还保留全能性，虽然这种全能性仅在特定条件下

才能表达出来。这与动物细胞的特性十分不同，好像植物细胞没有长时期发育上的记忆。

在植物的有性生殖中，胚胎发育具有类似于动物胚胎发育过程中的母体效应基因，如拟南芥中造成短珠被的 *SIN* 基因同时也影响胚胎发育的格局。

第三节 植物的分生组织及营养生长

一、植物的分生组织

成年植株的一切结构都是由胚根和苗端分生组织长成。它在胚中形成两个形态建成中心，即苗端和根端分生组织。分生组织(meristem)是一个很小的区域，它的细胞相对较小，并且未分化。在有花植物中其直径很少超过 250 μm。在一般植物的发育中，绝大多数(但不是所有)的细胞分裂都在分生组织中进行，有部分细胞仍保留分生组织特性，随后的大部分生长是由于细胞的膨大引起的。植物各种成年器官的结构是由顶端分生组织在植物生命活动的各个阶段逐渐分化、发育而成的。在生长过程中分生组织的体积基本上是不变的，细胞只是不断地离开它，并且开始分化。

顶端分生组织是植物在胚胎发育中在胚的纵轴向两端分别形成的特殊区域，它们在生长发育过程中可以连续不断地生长，分别称之为茎端分生组织和根端分生组织。顶端分生组织通过调节细胞增殖和分化的进程，使其细胞按特定的方式不断分裂和分化，一方面维持其自身作为顶端分生组织，另一方面形成植物的各种器官及发育成特定的形态。

最初的茎是由胚芽发展而成的。茎的形成是顶芽增长的结果。顶芽的尖端是生长点——顶端分生组织，它经常地进行着细胞分裂和伸长，一方面细胞数目增加，一方面细胞体积增大，同时按形态建成的规律分化成为叶、腋芽、节以及不很发达的节间。芽或茎顶端最主要的生长是节数的增多，这种生长方式称为顶端生长。此外，还有一种生长方式即节间部分的生长，称为居间生长(intercalary growth)。

苗端或根的分生组织的中央区域通常称为原分生组织(promeristem)。这个中央区的细胞称为原始细胞(initials)，它的行为在某种意义上像动物的干细胞(stem cell)，能自我更新并长成分生组织细胞。原始细胞通常分裂较慢，而它们的衍生物分裂较快，并逐步移向分生组织的周边部分。原始细胞细胞质浓厚，核质比很大，液泡小而分散，分化程度很低，它的存在使植物具有"无限"生长的能力。它大致相当于顶端原始细胞，或原套、原体或中央区母细胞。在苗端，原始细胞最终会被一些行为像原始细胞的另类细胞所替代。

一般分生组织或基本分生组织(general meristem)由原分生组织衍生出来的细胞所组成，具有很活跃的分生能力，其细胞的分化程度比原分生组织高一些，但是仍具备分生组织细胞的显著特征。它相当于周缘区和形成层状细胞区(过渡区)。由它形成植物体茎和叶的雏形。

半分生组织(semimeristem)是由一般分生组织衍生而来，它的细胞分化程度更高一些，液泡已聚集成为大液泡，但细胞核仍基本位于细胞中央，核质比仍较大。这类细胞是分生组织与基本组织的中间状态，是分化前途明确但还没有分化成薄壁细胞的组织。叶原基将来分化为叶，原形成层将来分化出茎和叶的维管系统，肋状分生组织将来分化成为髓。以上这些分生组织统称为初生分生组织(primary meristem)。

二、植物的营养生长

大多数维管植物的顶端是一群原分生组织细胞，通常可以明显地区分出不同的细胞层（从外到内由 3 层细胞 L1～L3 组成）及分区（顶端的中央区和周边的侧生分生组织与“肋状”分生组织）。可以利用植物嵌合体来判定每层细胞的命运。嵌合体（chimeras）的组织是由两种不同基因型的细胞组成，可以藉明显的特征将其区分开，如多倍性的核（核中含有超量的染色体）或色素沉积。分生组织经辐射或化学处理，例如用秋水仙素可以诱导多倍体，可以产生嵌合体。这样可产生所谓平周嵌合体——三层分生组织中的一层具有遗传标记，可以把这层细胞及其衍生后代同其他两层明确区分开（图 22.6）。追踪标记细胞的命运，就可以看到每一层长成什么结构。

在被子植物中，L1 层在所有植物结构中都生成表皮，L2 和 L3 层两者生成皮层和维管组织。可以用与果蝇研究相似的克隆分析方法来确定植物分生组织哪个区长成什么结构。通过 X 射线或激活转位因子（transposable element）产生单独的突变体或易辨认的分生组织细胞，比如使标记的细胞与植物体的其他细胞颜色不同。因为在植物发育过程中没有细胞的迁移，所以所有来自标记分生组织的细胞随着植物生长形成连成片的标记细胞。由此产生的嵌合体植株称为边缘嵌合体（mericlinal chimeras），仅植株或某个器官的一部分是克隆标记的。

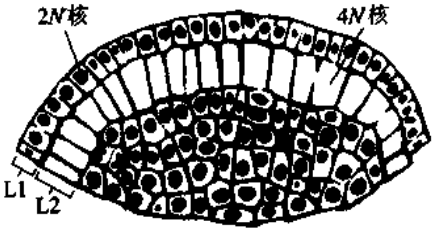


图 22.6　包含两种不同基因型细胞的嵌合分生组织（平周嵌合体）

在 L1 层中细胞为二倍体；而在 L2 层中细胞为四倍体，其染色体的数目是正常细胞的 2 倍，并且体积较大，很容易辨别

利用克隆分析的结果，已建立起玉米种子成熟胚的苗端分生组织发育的粗略途径。

由拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）的 *wus* 突变体的分析可见，在胚胎阶段即已建立了中央区和周边区，即球形胚的顶端区域分隔成中央区，由之成为茎端分生组织，而周边区域的细胞分化成子叶。当因顶端分生组织的活动，而把其周边的细胞逐步向下推向远离顶端的地方时，后者即形成器官和组织原基，并开始分化过程。*STM*（shoot meristemless）基因的突变导致胚胎发生过程中不能形成茎端分生组织。由拟南芥克隆的 *STM* 基因及其编码蛋白的氨基酸序列说明 *STM* 基因是编码同源结构域（homedomain）类的 *KN* 基因家族的一员，很可能是通过转录调控而影响苗端分生组织（shoot apex meristem，SAM）的形成。*STM* 基因在整个发育过程中涉及茎端分生组织的结构建成。茎端分生组织中央区的细胞分裂活性通常较低。显然，*STM* 基因在维持 SAM 中央区域细胞处于未分化状态具有重要的作用。*STM* 基因作用于 *WUS* 和 *ZLL* 基因的上游，后两基因为分生组织细胞获得相应的功能所需。茎端和花分生组织的中央区域未分化细胞的数目在突变体 *clv 1* 和 *clv 3* 中增加，从而使顶端分生组织的体积明显增大，说明 *CLV* 基因的作用与 *STM* 相反，对 SAM 中央区域细胞的未分化状态起负调控作用。*CLV 1* 编码膜结合的受体激酶，由此推测它可能通过蛋白质的磷酸化而影响 *STM* 基因产物的转录。而转基因植物已为 KAPP（kinase associated protein phosphatase）对 *CLV 1* 起负调控作用提供了证据：*TFL* 基因的突变导致中央区域细胞进行分化时 SAM 的活性即告终止。由此可以认为，分化是一个中央区域细胞受阻遏的发育选择（repressed developmental option）过程。

由茎端分生组织分化出新叶原基的过程与胚胎发育中子叶的形成过程相似。在 *stm* 突变体中,子叶和叶形成过程受到的影响相似也说明了这一点。通常在茎端分生组织起源的多数侧生器官均有腋生分生组织形成。在这方面,器官原基的形成与茎端分生组织状态的维持之间的相互关系是人们注意的重点。由拟南芥双突变体 *cuc1*·*cuc2* (cup-shaped cotyledon)形成的幼苗具有并合的子叶,而没有茎端分生组织;当在培养中诱导形成苗时,产生的花萼及雄蕊也是并合的。可见 *CUC1* 和 *CUC2* 基因对于形成分离的器官原基是必需的。*CUC2* 基因已经克隆,其编码蛋白质的氨基酸与矮牵牛(*Petunia hybrida*) *nam* 突变体的同源性达 56%,后一突变体的形态学特征与拟南芥的相似,也具并合的子叶,无茎端分生组织。现已发现若干基因与叶的形态有关,如拟南芥的 *angustifolia* 和 *rotundifolia* 突变体,玉米的 *narrow sheath* 突变体等。在叶中表达分生组织基因也会导致叶形态的改变,如在拟南芥使 *KNAT 1* 基因过量表达,会使形成的叶片边缘明显成为裙褶状,在烟草(*Nicotiana tabacum*)和拟南芥中过量表达类 *kn* - *1* 基因也导致在叶上形成分生组织。由玉米中克隆的同源异型基因 *kn* - *1* 基因以及由拟南芥中克隆的 *KNAT 1* 基因仅在 SAM 中表达,但在叶原基中不表达,这使得这类基因成为早期鉴定叶原基细胞的最好标记。然而,已发现番茄复叶的发育中涉及类 *kn* - *1* 基因的表达。在番茄(*Lycopersicon esculentum*)中过量表达 *kn* - *1* 基因,导致番茄叶开裂程度的增加,产生的叶片可具有多达 1 000 个小叶。生长素的极性运输在胚胎发生中对子叶分化发育的作用,已为利用生长素极性运输抑制剂处理芥菜幼胚以及拟南芥的生长素运输突变体 *pin1* 所证实。进而,利用烟草、景天树(*Crassula arboresions*)、二月兰(*Orychophragmus violaceus*)等植物的叶外植体建立的芽分化试验,以及烟草、青菜(*Brassica chinensis*)种子的萌发试验,均已证明在培养基中加入生长素极性运输抑制剂导致形成喇叭状叶或联体叶。所有这些也说明了叶片与子叶形态发生上的相似性,它们都受到生长素极性运输的调控。新近已由拟南芥中克隆了多个 *PIN* 基因,其编码的蛋白具有典型的膜蛋白结构,结合原位杂交结果显示,*PIN 1* 蛋白是生长素的一种极性运输体(polar transporter)。

根的顶端分生组织外面有根冠的存在,所以根尖分生组织事实上是一种近顶端的分生组织。在被子植物中,根在横切面上由外及里的每一层细胞均可追溯到由根尖分生组织形成的不同原始细胞,这些原始细胞围绕在由几个不分裂的顶端细胞组成的静止中心 (quiescent center,QC)周围。在拟南芥中,QC 由 4 个细胞组成。通过大量突变体及其组织细胞学的研究,已揭示 QC 细胞维持其周围的原始细胞作为"干细胞"的功能,控制着它们的分裂及其子细胞的分化。没有 QC 的存在,组织原始细胞的状态即不能维持。显然,根尖分生组织中 QC 细胞与其周围的各类组织原始细胞之间的信息物质的运输及作用,以及与从成熟的正在分化的细胞来的信息之间的平衡,在根的形态建成过程中具有重要的作用。根的侧生器官——侧根的形成并不起源于根尖分生组织的活动,而是通常由离根尖一定距离的中柱鞘产生的。侧根的这种内起源特性与茎干的侧生器官的外起源特性明显不同。根系的形成受到土壤中各种理化因素的影响。在拟南芥中已发现根系生长的差异明显受 NO_3^- 的影响,在富含 NO_3^- 的土壤中侧根伸长明显增强,而对主根的生长影响不大。其有关的基因 *ANR1* 已被克隆,并证实也是拟南芥的一种 MADS 盒基因。用转基因植物已证明它在拟南芥根发育的可塑性方面起决定性作用。根尖分生组织的结构相对较为简单。根尖分生组织及根的形态发生已成为发育分子生物学一个很好的研究系统。

顶端分生组织细胞的分裂和分化明显受到其所在位置的影响。实验证明,用激光处理杀死特定的细胞后,其相邻的细胞可以取代原有的细胞位置而获得相应的功能。茎尖分生组织可以看成

是一团在早期胚胎发育中形成的、从周围分化的组织中接受模式(pattern)形成信息的分裂细胞,而根尖分生组织则可以看作是一团缺乏内在模式形成信息的分裂细胞。无疑,顶端分生组织的活动也受到整体植物其他器官的影响。作为一个整体,植物激素以及代谢产物运输的调控起着重要的作用。随着越来越多的顶端分生组织突变体以及相应基因的克隆,无疑会加深人们对顶端分生组织的活动及其调控的认识,而这是植物整个形态发生的基础。

与动物一样,在植物中也存在着程序性凋亡,它不仅在维持植物正常的发育过程中起重要作用(例如胚柄退化、导管形成、各种叶型的形成、糊粉层细胞在种子萌发前的凋亡及助细胞退化等),而且是植物抵御病原体的重要手段。如植物被病原物侵染后引起的细胞死亡,即超敏反应(hypersensitivee response,HR)也是细胞凋亡的一种类型。超敏反应表现为受病原物感染的部位迅速出现死斑,由于死亡组织的迅速水解,阻断了病原物的营养供应;同时水杨酸合成增加,发病相关蛋白以及植物抗毒素等抗病原物质的积累,限制了病原物的扩散,实质物整体得到保护,这是植物抗病品种的一个显著特征。

植物细胞凋亡与动物细胞凋亡有许多相似的特征:细胞以单个或几个细胞散在分布,细胞质、染色质固缩,核 DNA 片段化,凋亡小体形成,细胞内容物无溢出,不引起炎症。但两者也有差异:植物凋亡细胞外形始终保持完整,细胞内容物在液泡中降解,细胞壁不被吞噬掉;动物细胞的凋亡则是形成凋亡小体,被邻近的细胞吞噬。目前已发现了许多与凋亡有关的基因,限于篇幅,不在此探讨。另外,研究发现,人、鼠、线虫、爪蟾的抗凋亡基因 *DAD1* 高度同源。1997 年,从拟南芥中克隆到 *AtDAD1* 基因,从水稻中克隆到与哺乳动物 *DAD1* 同源的 cDNA,它们的功能与动物的相似,表明动、植物细胞凋亡具有一定的保守性。

参考文献

1 许智宏.植物发育与生殖的研究:进展和展望.植物学报,1999,41:909~920

2 陈永喆等.植物营养器官发育解剖学.济南:山东大学出版社,1998

3 杨征等.植物细胞凋亡研究进展.生物化学与生物物理进展,1999,26:439~443

4 Chong K,Bao S L,Xu T,*et al*.Functional analysis of the ver gene using antisense transgenic wheat.Physiol Plant,1998,102:87~92

5 Galweiler L,Guan C,Muller A,*et al*.Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue.Science,1998,282:2 226~2 230

6 Jocelyn E M,Benfey P N.Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana.Development,1997,124:33~44

第二十三章　植物的生殖生长

第一节　成花诱导

一、高等植物的成花

高等植物经过一段时期的营养生长后，在合适的外界条件下（其中重要的有日照长度、光质及温度）即转向生殖发育（reproductive development），开始花器官的分化形成。植物的开花状态可以逆转，说明涉及转向开花的基因及过程对于生殖发育的启动及维持均是重要的。长期以来，植物生理学家利用不同的植物及组织培养成花系统，已在光周期诱导、春化作用、激素和代谢产物在开花过程中的生理作用等方面进行了大量研究。在此基础上，Bernier 提出了开花诱导的多因子模型（multifactorial model）。根据此模型，植物在启动开花之前，体内各种有关的生长调节物质和代谢产物作为成花的促进因子或抑制因子，必须在特定的时间达到合适的浓度，它们之间的相互作用最终导致茎尖分生组织（或侧芽分生组织）由营养生长转向生殖生长。对拟南芥、豌豆（*Pisum sativum*）和谷类等植物开花时间的遗传分析支持这种开花的多因子调控假说。

二、成花的调控

利用拟南芥的突变体已定位了约 80 个影响开花的基因。其中一些基因促进开花，另一些抑制开花；一些基因促进开花的作用并不受生长条件的影响，而另一些则明显受环境因素的作用。通常可将参与开花诱导的基因分成两类：与开花时间有关的基因（flowering time gene）和分生组织特征基因（meristem identify gene）。前一类基因的突变会使开花时间提早或延迟，这类基因中促进开花的包括 *CONSTANS*（*CO*）、*LUMINIDEPENDENS*（*LD*）、*FCA*、*ELF3* 等，抑制开花的如 *EMF 1*。后一类基因决定新形成的原基的发育方向是继续营养生长的发育方式，还是转向花的发育，这类基因如 *TERMINAL FLOWER*（*TFL 1*）和 *TFL 2*、*CLF*、*LEAFY*（*LFY*）、*APETALA 1*（*AP 1*）和 *AP 2*、*CAULIFLOWER*（*CAL*）等。根据影响开花时间的突变体对环境因子（春化和光周期）的反应，结合遗传分析，在拟南芥中已确立至少存在四条途径影响开花时间，其中两条途径是调控植物本身的发育状态，即① 开花抑制途径（floral repression pathway），此途径中有关的基因的功能是在植物发育到一定大小或年龄之前抑制开花（如 *TFL 1*、*CLF*、*WLC*、*EMF* 等）；② 自主促进途径（autonomous promotion pathway），其有关的基因随植物的发育，起着拮抗上述抑制开花基因的作用（如 *LD*、*FCA*、*FVE*、*FPA* 等）。另两条途径，即光周期促进途径（photoperiodic promotion pathway）及春化促进途径（vernalization promotion pathway）受环境因子的影响。近年研究表明，拟南芥

FT 基因受光周期促进途径和自主促进途径的双重控制。用 T－DNA 激活标记法，可分离出 *FT* 基因。*FT* 位于第一条染色体的下段，含 4 个外显子和 3 个内含子，编码序列约 600 bp。*FT* 基因的结构和序列显示出与 *TFL 1* 显著的同源性，*FT* 开放阅读框编码的蛋白与 *TFL 1* 基因产物相似。*FT* 的表达可用反转录 PCR(RT-PCR)进行分析。*FT* 在幼苗和成熟植株的各组织中都有表达，但表达量不同。长日照下，在 6～10 天的植株中，*FT* 在子叶、下胚轴、苗端表达水平较高，而根中几乎没有。而在成熟的植株中，*FT* 在花和未成熟的长角果里表达水平最高。此外，可测到在长日照和短日照控制下，*FT* mRNA 的水平随时间的增加而逐渐增加。长日照下，*FT* 在第 4 天被首次检出。短日照下，*FT* 表达的正调控被延缓和减弱。在 *co－1* 突变体中，*FT* 的正调控表达被延缓，且水平降低，表明在早期营养阶段它可能需要 *CO*。*TFL 1* 属于分生组织特征性基因，如前所述，它与 *FT* 具显著同源性，但两者在开花上则有明显的相反作用，其缺失或异位表达产生相反的表型。*FT* 的缺失可导致开花延迟，而 *TFL 1* 的缺失导致开花提前且形成顶端花。*FT* 的过表达导致花独立于光周期和 *CO* 过早开放，而 *TFL 1* 的过表达则明显延长营养生长及花序生长阶段而导致开花延缓。

胚胎花基因(*EMF*)在阻遏开花中具有重要的作用，其突变体 *emf 1* 和 *emf 2* 表现出没有明显的营养生长阶段。对于 *TFL 1* 基因，根据其与金鱼草(*Anthirrhinum majus*)相应的基因 *CEN* 的相似性，以及突变体 *tfl 1* 开花提前，可以认为 *TFL 1* 基因抑制顶端花的形成，推迟由营养生长向生殖发育的转变。过量表达 *TFL 1* 明显延长营养生长及花序生长阶段。*TFL 1* 推迟开花的功能可能是通过阻遏自主促进途径中促进开花基因(如 *FCA*、*FVE* 和 *FPA*)的作用而表现出来的。而 *CLF* 和 *WLC* 基因是通过阻遏某些花分生组织特征性基因而推迟开花的。在 *clf* 突变体中 *AG* 基因在叶片、花序、茎和花中异位表达，而 *AG* 和 *AP 3* 在 *wlc* 突变体中异位表达，说明 *CLF* 和 *WLC* 抑制花分生组织特征性基因在营养组织中的表达。

拟南芥 *CO* 的突变体在非诱导的短日照条件下正常，但在长日照下开花延迟，而 *FCA* 基因的功能不受日照长短的影响。在 mRNA 水平上也反映出同样的情况，*CO* mRNA 的量在长日照下比短日照下高得多，而 *FCA* 和另一也不受日照长短影响的基因 *LD* 的 mRNA 不受日照长短的影响。Simon 等用转基因技术在 *co* 突变体中表达由 *CO* 与鼠糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor)配体结合域的基因片段组成的融合基因(*35S*::*CO*:*GR*)。用人工合成的糖皮质激素 DEX(dexamethasone)处理这一转基因植物，可诱导导入的 *CO* 基因表达，并可研究它对分生组织特征性基因表达的影响。结果表明，*CO* 的表达可迅速诱导 *LFY* 和 *TFL1* 基因的转录，后两基因的转录在野生型拟南芥中为长日照周期所诱导。在不同时间用 DEX 处理，即可诱导转基因植物在不同的时间开花，这至少用模式植物证明了通过基因工程技术调控植物的开花时间是可能的。现已知 *CO* 和 *LD* 基因编码转录因子，而 *FCA* 编码的是 RNA 结合蛋白，这 3 个基因可能直接作用于控制花形成的目标基因。

自从 Garner 和 Allard 在 20 世纪 20 年代用烟草和大豆(*Glycine max*)所做的经典实验中证实光周期在开花中的作用以来，植物发育生理方面的大量研究早已证明光在植物由营养生长转向生殖发育过程中的作用与 2 种光受体有关，即光敏色素(红光－远红光受体)和隐色素(cryptochrome，蓝光－紫外光 A 受体)。至今，已在不同植物中分离克隆出多种光敏色素蛋白的基因，如拟南芥中有 5 种：*PHYA*～*PHYE*，在番茄中也有 5 种：*PHYA*、*PHYB 1*、*PHYB 2*、*PHYE* 和 *PHYF*。在这些光敏色素中，研究得最多的是光敏色素 A 和 B。通过突变体和转基因植物的研究表明它们在光形

态发生中确有重要作用。光敏色素在调控植物生长发育的信号传导过程中的生理生化作用仍有待进一步研究。在拟南芥中已发现有2种隐色素(CRY1和CRY2)。研究表明,拟南芥的隐色素突变体 *cry 2* 是一种晚花突变体。

虽然在40年前Zeevaart就证实了在光周期诱导中,开花诱导的信号在叶片中产生,并需通过韧皮部运输到茎端发生作用,使之形成花,之后不少研究者试图分离这一诱导物,但至今对其生化性质仍不清楚。单子叶植物毒麦(*Lolium temulentum*)的Ceres品系只需一个长日照诱导处理即可开花。从长日照诱导后的毒麦植株上分离茎尖培养发现,诱导后第一天切下的茎尖在培养中需加入GA3才能诱导使之开花,而第二天切下的则无需外加GA3。据此,McDaniel和Hartnett认为光周期对于毒麦的开花诱导是一个分为两步的过程,即在叶中形成的第一个信号物到达茎端后诱导使之成为成花决定状态(florally determined state);然后,第二个信号物即GA促进成花决定状态的表达。Kania等已从拟南芥中克隆出 *FPF 1* 基因(flowering promoting factor 1),此基因在长日植物白芥(*Sinapis alba*)和拟南芥中,在光周期开花诱导后很快在顶端分生组织中表达,先只在分生组织的周边区表达,而后在花分生组织和形成次生花序的腋生分生组织中表达。此基因编码一个12.6 kDa蛋白,研究表明它的功能涉及依赖GA的信息传导过程,以及参与在转向开花过程中顶端分生组织对GA的反应。利用玉米茎尖培养发现,不管切取茎尖前植物已有多少片叶子,离体茎尖在形成花之前必须重新形成一定数目的叶片。然而,如果在切取茎尖时带有4~6个幼小的叶原基,即可避免这种发育程序的重新设置,这说明幼叶中的一些信号影响SAM的发育。玉米的 *id 1* 突变体表现出从营养生长向生殖生长的转变过程出现故障,在正常生长季节内不能开花,当生长期延长最终形成花序时也表现出营养生长的特征。*ID 1* 基因已经克隆,并被证实是一种锌指蛋白,表明它可能是一种转录因子。*ID 1* 基因主要在幼叶中表达,而在SAM中不表达,说明 *ID 1* 基因在开花诱导中的作用涉及在幼叶中形成的一种可运转的信号分子,后者影响SAM转向生殖发育。

很多植物需要经过低温处理(如越冬作物)才能诱导或加速开花,这一过程通常称之为春化作用。与光周期诱导开花过程不同,春化本身(低温诱导)并不诱导开花,而只是使植物处于准备开花状态。Burn等提出春化引起DNA的去甲基化,这使得在GA生物合成中重要的异贝壳杉烯酸羟化酶基因得以表达。一些实验已表明DNA的甲基化在确定或维持分生组织的不同发育状态起作用。虽然导入甲基转移酶的反义基因的转基因植物表现出发育上的异常以及早花,但去甲基化在春化中的作用仍不很清楚,因为在这些转反义基因的转基因植物中明显的去甲基化并没有导致转基因植物及其后代不需春化。遗传学研究表明,在小麦中至少有4个基因控制春化过程。在拟南芥中也已得到多个对春化敏感的突变体(如 *vrn 1* 和 *vrn 2*),对这些突变体的研究以及最终克隆这些基因无疑将对了解春化过程的分子机制具有重要意义。种康等从经低温诱导的冬小麦cDNA文库中筛选出2个对春化处理特异的cDNA克隆ver203和ver17。为了研究ver203的功能,将其反义基因导入小麦,结果发现在326株春化过的反义转基因小麦中有6株抽穗明显受到抑制。该基因3′端cDNA克隆核苷酸序列检索表明,它与茉莉酸诱导基因有部分同源,推测它可能参与茉莉酸的信号传导途径。

正常花的形成需要分生组织特征性基因如 *LFY*, *AP 1* 等的表达。*LFY* 基因在新形成的花原基中表达很早,说明它对于诱导花形成是必需的,这也为转基因植物所证实:*LFY* 基因在35S启动子驱动下,能使转基因拟南芥所有的侧芽全部转变为花,主茎的顶端转变为一不正常的顶花。在一些情况中,转基因植物在形成3片真叶后即形成花,但这类植物通常不育,不能正常繁殖。将同一

嵌合基因(35S::*LFY*)导入烟草和杂种杨(*Populus tremula* × *tremuloides*),这些植物提早开花。特别对于杨树,通常8~10年后才开花,但转基因杨在经6~7个月的营养生长后即形成顶花以及单个的腋生雄花,只是花药不能开裂。这一结果说明 *LFY* 的活性在亲缘关系很远的植物之间是相当保守的,同时也表明通过导入 *LFY* 基因有可能调控开花的时间。有意思的是,只有拟南芥的 *LFY* 基因在营养生长阶段有相当广泛的表达,而金鱼草中的同源基因 *FLO* 则并非如此。在形成分生组织过程中的负调控基因 *TFL 1* 也表现出类似的区别:拟南芥 *TFL 1* 基因的表达不限于生殖发育阶段,它在营养生长阶段也表达,以延迟开花;而金鱼草的同源基因在营养生长阶段并不表达。如前所述,*LFY* 和 *TFL 1* 均是受 *CO* 诱导而迅速被激活的基因,而 *AP 1* 的转录则要晚得多。据此说明 *AP 1* 可能是 *LFY* 基因的一个下游效应子,而用 35S::*AP1* 转化拟南芥获得的转基因植物的表型与 35S::*LFY* 相似也是一个佐证。由于 35S::*AP 1* 拟南芥在一些方面又与 *tfl 1* 单基因突变体或 *tfl 1*/*tfl 2* 双突变体的表型相似,因此认为至少 35S::*AP 1* 在开始时的影响可能是由于抑制了 *TFL 1* 基因所引起的。*AP 1* 与 *LFY* 不同,将 35S::*AP 1* 导入杂种杨,并没有得到与 *LFY* 相似的结果,说明 *LFY* 和 *AP 1* 在诱导开花方面还是有所差异,当然也可能是 *LFY* 的作用在不同物种之间比 *AP 1* 更为保守所致。

第二节　花器官的发育

一、对称花的发育

有关花发育中调控各类花器官形成的器官特征基因(organ identity gene)的克隆及其功能分析,是近年植物发育分子生物学研究中的重大突破之一。这些基因是在对拟南芥和金鱼草获得的各类花器官的同源异型突变体的研究中发现的。在花茎中,茎分生组织转化成花序分生组织,后者可生成一个或更多的花分生组织,每个花分生组织可发育成单独的花。花分生组织进行细胞分裂,经细胞分化和细胞增长产生花发育的特殊部分,此部分发育成花原基。一朵花由4个同心轮结构组成。这反映了在花分生组织中花原基的排列次序。萼片(轮1)由分生组织的最外层形成,花瓣(轮2)由紧靠最外层的一层分生组织形成,分生组织的内层产生了雄性生殖器官——雄蕊(轮3),雌性生殖器官——心皮(轮4)由分生组织中心发育而来。在拟南芥属植物花分生组织中,有15个分离的原基,形成的花中含有4枚萼片,4枚花瓣,6枚雄蕊和由2个心皮发育成的1枚雌蕊。这些原基由分生组织的特殊部位形成,发育成各自独有的结构,关键问题是发育着的花细胞如何获得和记录它们的位置的同一性。

在拟南芥属和其他植物中,同源异型突变导致了畸形花的出现。花的一部分的类型被另一种类型代替。拟南芥属花的同源异型突变可分为3种。每种突变都会影响其他相邻的两轮器官。第一种突变(*apetala 2* 即是一个例子)影响了轮1和轮2,心皮取代了轮1的萼片,雄蕊取代了轮2的花瓣,花的表型由外向内依次为心皮、雄蕊、雄蕊、心皮。第二种同源突变影响了轮2和轮3,在这一类里,*apetala 3* 和 *pistillata* 使萼片取代了轮2的花瓣,心皮取代了轮3的雄蕊,花的表型由外向内依次为萼片、萼片、心皮、心皮。第三种突变影响了轮3和轮4,花瓣取代了轮3的雄蕊,萼片或其他可见的结构取代了轮4,属于这类的无性突变株在其中心有一套额外的萼片和花瓣代替了生

殖器官。

这些表型可用相当简单的基因活动模式来解释。我们设想花的分生组织可分成三个重叠区A、B、C。每一区分别与三种同源异型图标的活动位点相对应。A区覆盖轮1和轮2，B区覆盖轮2、轮3，C区则是轮3、轮4。我们下一步设想A、B、C区各有相应的调节功能A、B、C。它们联合起来使每轮有独有的同一性，也就产生了特殊器官同一性(图23.1 A)。A在轮1和轮2中表达，B在轮2、轮3中表达，C则在轮3、轮4中表达。此外，A能抑制C在轮1和轮2中起作用，C又能抑制A在轮3、轮4中起作用，也就是说A与C的功能是相互抑制的。任何花的分生组织中，当A单独活动时(即轮1)将发育成萼片；A和B一起直接决定了轮2花瓣的发育；B和C一起作用时决定轮3的雄蕊；C单独可决定轮4心皮的形成。因此，第一种突变(如 *apetala 2*)干扰了A的功能后就不能阻止C在轮1、轮2中的表达，故C在所有轮中都能表达，形成的表型为心皮、雄蕊、雄蕊、心皮(图23.1 A)。B发生突变时，即第二种突变(*apetala 3*)，导致只有A在轮1、轮2中起作用，只有C在轮3、轮4中起作用，形成的表型为萼片、萼片、心皮、心皮(图23.1B)。若C功能基因发生突变(如无性突变株)则导致A在整个轮中起作用，产生的表型为萼片、花瓣、花瓣、萼片(图23.1 C)。

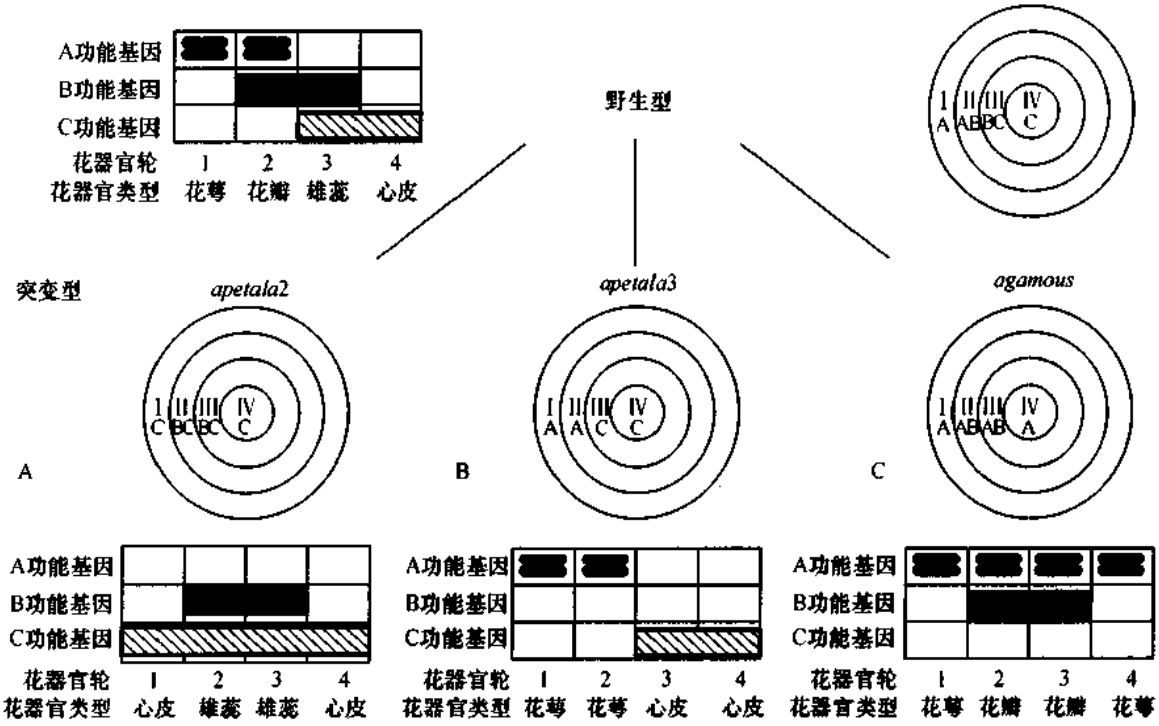


图23.1 拟南芥(*Arabidopsis*)野生型及突变型花的模式图

该模型说明了如下3点：① 野生型花的每一轮器官的形成均涉及到3类器官特征基因中的1种或2种的组合；② A和C的活性是互相抑制的，这已为不同的突变体及转基因植物所证实；③ 3类基因的影响在花的发育中具有各自的位置效应。现已在拟南芥中克隆的具有A功能的基因有 *AP 1* 和 *AP 2*，具B功能的有 *AP 3* 和 *PI*，具C功能的有 *AG*。相应在金鱼草中具有A功能的是 *SQUA*，具B功能的是 *DEF* 和 *GLO*，具C功能的是 *PLE*，只有拟南芥中的 *AP 2* 在金鱼草中未发

现其同源基因。这3类同源异型基因编码的蛋白质的N端均带有一个保守性很强的DNA结合序列MADS盒。在研究调控胚珠发育的基因中，从矮牵牛(*Petunia hybrida*)中已克隆出2个与之有关的MADS盒基因*FBP 7*和*FBP 11*，它们专一地在胚珠原基、珠被和珠柄中表达。在转基因植物中抑制*FBP 7*和*FBP 11*基因的表达导致在本该形成胚珠的地方却发育成心皮状结构。用35S启动子使*FBP 11*基因在转基因植物中过量表达，结果在花萼和花瓣上形成胚珠，在表达*FBP 11*的花萼表面也形成了胎座组织，从而说明*FBP 11*的表达与胚珠和胎座组织的形成有关，而胚珠代表了一类花器官，它的发育为MADS盒基因*FBP 7*和*FBP 11*所调控。为此，有人已提出把ABC模型延伸，将*FBP 7*和*FBP 11*基因列为D基因，由它决定形成胎座和胚珠的中央分生组织的特征。

在分化发育研究中值得注意的一个问题是，同源异型基因的表达，通常在发育早期即表现出十分特有的模式，问题是它的表达又是如何通过细胞分裂在以后的发育时期维持下去的。在这方面，有关细胞间相互关系的研究已表明，顶端分生组织不同层细胞之间信息分子的传输对于花器官的分化发育有重要的影响。而当细胞分化的特定命运得以自主地维持时，细胞的命运即已决定，这时与其周围环境通常无关。尽管花的三层分生组织都参与花器官形成，但每层细胞对一定结构的作用可发生变化。一层细胞可变成另一层的一部分而不干扰正常形态，这暗示细胞在分生组织中的位置决定了它将来的功能。

二、不对称花的发育

在控制花的不对称方面，近年也获得重大进展。金鱼草属的花有4轮，与拟南芥不同的是，它们有5枚萼片、5枚花瓣、4枚雄蕊和2个联合心皮。金鱼草属的花有一个显著的左右对称轴。它需一种额外的模式元件，即在所有的花的基础辐射对称模式上再加上一种两侧对称模式。不同于那些控制花器官同一性的另一组同源异型基因在左右对称模式中起作用。至少已发现有4个基因位点与金鱼草背腹不对称结构的形成有关，其中3个(*CYC*、*RAD*和*DICH*)引起花的背特性(ventralization)，另1个基因*DIV*引起腹特性(dorsalization)。

花器官是高等植物进化中最为变化多端的结构，对多数影响花器官形成和发育的各类基因的作用及相互关系仍有待进一步的研究，特别是在已克隆的一批同源异型基因对其下游基因的调控方面。一个例子是已报道*NAP*是*AP3/PI*的直接靶基因，35S::*AntiNAP*转基因植物中，雄蕊缺失，表明*NAP*的功能对于*AP3/PI*所控制的发育过程是十分重要的。但这方面总的说来至今仍知之甚微。对于禾谷类作物花发育的同源异型基因的研究工作还很少。对花的不对称基因的克隆及功能分析也刚开始，其生化功能尚不清楚。这些方面的研究，不仅在理论上对于花结构的进化、花的发育具有重要意义，而且对于调控花的形态，对于在园艺和作物育种也可望有重要作用。

第三节　植物的双受精

在植物界，双受精作用是被子植物独有的特征。双受精在被子植物中具有普遍性。被子植物的双受精是一个很长的过程，在配子融合前还有一个花粉与雌蕊之间相互作用的阶段(配合前期)，在此不作讨论。

一、花粉管进入胚囊

花粉管起载运精细胞到雌配子体中的作用。早期光镜观察的结果，发现了在不同植物中花粉管进入胚囊有不同的途径，并注意到助细胞退化的现象。不过，当时对助细胞在受精中有重要的作用是不清楚的。20 世纪 60 年代以来，大量超微结构的观察，得出一致的结论，即除缺少助细胞的白花丹属(*Plumbago*)植物外，花粉管都是到达胚囊中的一个助细胞。接受花粉管的助细胞或迟或早退化，大多数是在传粉后和花粉管在花柱中生长时一个助细胞退化。通常在受精前后胚囊中的两个助细胞中仅一个退化，而花粉管进入胚囊后总是到达退化的助细胞中。根据现有的知识，助细胞退化与引导花粉管进入胚囊、促使花粉管释放精子和帮助实现精子的转移有关。在受精过程中，助细胞程序性的凋亡有重要的意义。

目前一般认为，助细胞的退化是被某种信号的传递所诱导。通过棉花胚珠的离体培养实验，发现未授粉的花的胚珠在离体培养中，当培养基中加入赤霉素和吲哚乙酸时，可模拟发生像体内一样的助细胞退化，进一步证明仅赤霉素起作用。根据这一实验结果，可以认为花粉管在花柱中生长时产生的信号使赤霉素增加，并扩散至胚囊，从而引起一个助细胞退化。助细胞中高含量的钙可能是导致它退化的更直接的因素，而钙又是吸引花粉管进入胚囊的重要因素之一。

在胚囊中的两个助细胞哪一个退化，哪一个保留，在一些植物中是有规律的。例如大麦，退化个助细胞多位于近胎座一侧；在向日葵中，退化助细胞位于近珠柄一侧。助细胞退化的这种位置效应，推测是由花粉管产生的信号沿珠柄一侧扩散到胚囊，从而诱导该侧的助细胞退化造成的。不过，有的植物的助细胞退化在位置上的倾向性是不明显的，例如亚麻，而在烟草中是随机的。因此，为什么仅一个助细胞退化以及选择性的机制仍有待进一步研究。

花粉管定向地生长和进入珠孔是由胚珠产生的向化性物质的作用，向化性信号来自胚囊的助细胞。吸引花粉管生长的物质现在认为至少包括 3 类物质：简单的无机盐(如钙)、单糖(如葡萄糖)和低分子量的酸性蛋白。钙对于花粉管在体内的生长是必不可少的，已有很多的实验证明在助细胞中有高浓度的钙。

首先在棉花中用显微灰化法证明了助细胞富含灰分，为助细胞中含丰富的钙提供了初步的证据。其后设计的体外实验——用赤霉素(代替自然传粉)诱导一个助细胞退化的实验成功，由此提出一个假说：赤霉素到达胚囊，启动了一个助细胞退化，存在于液泡内的高浓度的钙在液泡膜破坏时被释放出来，从而造成助细胞与相邻珠心细胞的钙的梯度分布，引导花粉管向助细胞生长并进入其中。在高钙浓度的解体助细胞中，花粉管停止生长并释放出内容物。上述假说已被一些实验支持。

通常花粉管在它进入的助细胞中停止生长和释放精子，这一事态被认为是由于当花粉管进入助细胞后，它周围的环境发生改变所触发。在这一环境中除高钙浓度因素的作用外，还可能有其他无机元素及紧张压、氧分压和一些未知因素的影响。另一方面，也可能存在内在的因素，如内在渗透压的驱动力可使花粉管本身非常脆弱。在综合因素作用下，花粉管通过末端的孔释放出精子及其内容物。

二、雄配子到达雌配子

在配子融合之前，雄配子必需到达雌配子所在的位置。被子植物的精子缺乏鞭毛这种能动的

结构，它们首先由花粉管将其运送至胚囊中，然后一对精子被释放至卵和中央细胞邻近的位置。一对雄配子同时到达雌配子的机制，可从雄性生殖单位的概念得到解释。应用电镜和三维重构技术，对许多植物（包括双子叶和单子叶植物）进行了研究，发现一对精细胞在花粉粒或花粉管中彼此之间及与营养核之间维持紧密的连接，形成一个结构单位，称为雄性生殖单位（male germ unit）。一对精细胞之间相互连接的关系，可说明为什么姐妹精细胞在花粉管中移动和在胚囊中被释放是同步进行的。一般认为，雄性生殖单位在功能上可使精细胞有序地到达它们各自的雌性靶细胞。

雄配子被运送到雌配子的动力机制可能与细胞骨架有关。在花粉管中，生殖细胞或精细胞总是随着花粉管的生长向管的末端移动。移动的动力有两种假说：一是精细胞具有独立活动的能力，二是被动地为细胞质流携带着前进。当前，细胞骨架研究的资料，或支持第一种或对第二种假说有利。基于电镜的观察揭示了在生殖细胞或精细胞的细胞质中有纵向分布的成束的微管，束中的微管之间存在横向的连接。有人认为在被子植物生殖细胞与精细胞中，微管束中横桥的结构形式类似于动物和低等植物精子鞭毛的轴纤丝（axoneme），它们在功能上可能是相似的。另一方面，微丝的研究揭示了在花粉管细胞质中有丰富的轴向排列的肌动蛋白微丝，它们表现出与雄性生殖单位成员之间存在密切的关系，这更有利于说明精细胞的移动是由营养细胞质所控制的，微丝在其中起重要的作用。应用电镜和免疫荧光定位法，证明了微丝或肌球蛋白存在于生殖细胞和营养核的表面，微丝也存在于精细胞的表面。生殖细胞或精细胞在花粉管中的运动可能依赖于肌动蛋白－肌球蛋白系统。此外，用秋水仙素处理可使生殖细胞的微管破坏，细胞形状改变，但不影响它进入和通过花粉管的移动。可以认为生殖细胞中一般缺少微丝，而营养细胞质中则大量存在，似乎生殖细胞、精细胞及营养核的运动不可能是自己推进，而是由于营养细胞质的控制。生殖细胞和精细胞中微管的复合排列和连接的横桥结构，推测是原始具鞭毛的精细胞的轴纤丝的进化，因此可能保留了机械化学的活动性。但是，目前大量的证据表明微管束的功能不在于移动，而与细胞形态维持有关。

一般认为，精细胞被释放后似乎不需要什么动力即可到达融合的靶区。最近，通过对胚囊中微丝的研究，有人提出精细胞这种短距离的移动可能与独特的微丝分布有关。利用分离的烟草胚囊和用罗丹明标记的鬼笔环肽作为微丝的荧光探针的观察，揭示了当花粉管到达胚囊之前，在雄配子到靶区的道路上存在两个肌动蛋白“冠”或带：一个在助细胞的合点端，从退化的助细胞中部侧面区域扩展至卵核区，与助细胞的边界一致；另一个从助细胞与卵细胞交界一侧的边缘至极核区域。微丝的免疫金电镜定位显示这一区域集中了抗肌动蛋白免疫金标记的电子浓密颗粒。白花丹缺少助细胞，当花粉管进入胚囊时，在卵与中央细胞之间的间隙区，即配子发生融合的区域，微丝集聚形成类似的“冠”。根据以上两种植物中当花粉管到达胚囊前或在释放精细胞时肌动蛋白“冠”的形成，推测与精细胞移动到它们融合的雌配子的位置相关。肌动蛋白微丝在精细胞最终到达雌配子的过程中所起的作用的设想，可促进人们进一步从胚囊中细胞骨架的分布去探索精细胞移动的机制。通过电镜的观察，曾在多种植物中描述了在卵、中央细胞和助细胞之间存在电子浓密的物质，根据它与微丝“冠”（带）的位置相当，推测它是代表微丝带的区域。这一假设如果得到证实，可对花粉管进入胚囊前后在雌性生殖单位成员之间胞间区存在的电子浓密物质的性质和意义得到正确的认识。

三、配子的融合

配子融合是受精过程最后的关键环节。对这一过程的一般规律现已有了基本的认识，并且还注意到不少有意义的现象。例如与卵和与极核融合的精子之间在大小和形状上可能有差别(即所谓的精子二型性)；融合时的雄配子是细胞或仅仅是核，细胞质被排斥在卵外还是同核一起进入卵；通常只有一个花粉管进入胚珠，也有额外花粉管进入的偶然现象。

前面已述及一对精细胞与营养核形成一个结构单位(雄性生殖单位)，保证了姐妹精细胞同时被释放至胚囊中。在胚囊中尚未融合的精细胞有许多共同的特点：① 当花粉管释放后，雄性生殖单位的成员分离，仅在少数观察中看到它们保持短暂的接触；② 精细胞这时不存在细胞壁，并由于脱离了原来包围它们的花粉管的内质膜，精子的质膜暴露在退化的助细胞中。这些特点反映了精细胞在结构上为进一步实现配子的融合准备好了条件。

在雌配子体方面，卵与中央细胞在受精作用中是精子的受体。1984 年 Dumas 等提出雌性生殖单位(female germ unit)的概念，他们认为卵器(卵 + 助细胞)与中央细胞组成一个结构单位，称为雌性生殖单位，其主要特点是在受精的靶区缺少细胞壁，从而使雌、雄配子得以原生质体状态相互融合。雌性生殖单位的概念已得到许多植物胚囊超微结构资料的支持。雌性生殖单位是当胚囊发育到一定临界状态，即准备受精之前才组成的一个暂时的单位，当受精完成后，在原来缺少细胞壁的部位再生新壁，合子重新被完整的细胞壁包围。在受精前雌性生殖单位成员之间形成的一个无壁区域的结构特点，可认为与雌配子接受雄配子的功能相适应，无壁的区域使配子之间能通过膜的融合而合为一体。

卵、助细胞和中央细胞组成一个执行双受精功能的结构单位。卵是主体，其他成员的协调作用保证了它实现正常的受精和进一步的发育。一般认为，卵细胞在生理上较不活跃，合成代谢水平较低，但也有人认为，未受精的卵细胞具较高的合成潜能，所谓静止状态只是与助细胞相比而言。

配子融合的过程从彼此的质膜融合开始。首先是两个配子质膜的接触，进而开始在膜的一个位点、然后在数个位点融合，接着是融合的膜崩溃，直至整个结合区的膜瓦解。最后核质贯连。融合后新的核膜是由雄配子与雌配子的核膜共同组成。膜融合时必需的能量或条件因素尚不很清楚，可能涉及特定的融合基因产物的受体或 pH、渗透压及离子因素等条件。前面述及的在精细胞所进入的退化助细胞中存在的游离钙可能对促进膜的融合也起一定作用。

Gerassimova - Nawaschina 曾提出一个假说，认为在受精前精细胞核与卵核处于不同的有丝分裂相。精核为末期，卵核为静止期，两核融合时存在 3 种形式，即有丝分裂前、有丝分裂后和这两种形式之间的中间型。根据几种植物配子核融合时的事态与有丝分裂的关系，高等植物受精可以归纳为有丝分裂前和有丝分裂后 2 种类型：前一种类型是精核与卵核的物质完全混合后进入有丝分裂，而后一类型是精核与卵核在受精卵第一次有丝分裂后才实现核物质的融合。这两种形式与动物界受精作用核融合存在的 2 种基本形式一致。有丝分裂前类型广泛存在被子植物中，有丝分裂后类型见于裸子植物中，如油松和三尖杉。在油松的受精卵中可见精核与卵核各自形成自己的纺锤体，它们的核物质的融合是在受精卵第一次有丝分裂后实现的。

根据裸子植物长叶麻黄(*Ephedra trifurca*)和显轴买麻藤(*Gnetum gnemon*)受精与细胞周期研究的结果与被子植物的资料的比较，将种子植物核配合区分为 3 种基本形式：① G_1 期核配合——在整个核配合过程中，雄性和雌性配子核都在 1C DNA 水平，在合子中进行 DNA 复制；② S

期核配合——配子核在1C DNA水平开始融合，在完全融合前通过细胞周期的S期；③ G_2 期配合——雄性和雌性配子核在临近融合时通过细胞周期的S期。根据这种区分标准，被子植物的大麦和玉米都属 G_1 期核配合型。这种类型与基于细胞学观察所区分的有丝分裂前类型一致。裸子植物的长叶麻黄及显轴买麻藤分别属S期核配合型和 G_2 期配合型。它们均属于有丝分裂后型。G_1 期核配合型，即有丝分裂前型在被子植物中是普遍存在的。

通常受精只涉及一个花粉管的一对精细胞分别与卵和中央细胞的融合。当有多个花粉管到达胚囊时，有可能与不同的花粉携带的精细胞受精，称为异雄核受精(hetero－fertilization)，这是极少见的。因此，被子植物精细胞之间似乎不存在竞争。然而，一对精细胞之间是否有差异？是否其中一个预定与卵受精形成合子？这个问题在早期的胚胎学研究中已经提出。近十几年来，应用定量细胞学及三维重构技术，确定了少数植物的精子具异型性。白花丹的一对精细胞之间的差异不仅表现在细胞的大小和形状上，而且所含的线粒体和质体的数量也明显不同。这种异型的精子还表现出高频率的倾向受精现象，即姐妹精细胞中富含质体而线粒体少的一个与卵融合，不含质体而线粒体多的一个与中央细胞融合。倾向受精是以一对精细胞之间有分化为前提，除白花丹外，尚有不超过10种植物存在异型精子的特性。有几种植物的一对精细胞是无差异的，例如大麦、矮牵牛和烟草。因此，从精细胞的形态及细胞质组分来看，精子异型和同型两种形式似乎在被子植物都存在，而且在同一种植物中似乎可以有两种形式，例如从牵牛分离的大量精子对中，观察到大多数是同型的，但也发现有的姐妹精子的大小、形状和细胞器DNA数量是有差异的。

倾向受精的可能性从体内研究是较难判断的。近来报道了玉米精子与卵在体外融合的实验，在含5 mmol/L Ca^{2+} 的介质中约有80%精－卵对能融合，这至少可假定在离体条件下玉米不存在倾向受精。

动物界的受精作用已被证明与配子表面识别物质有关，它使卵与精细胞结合在一起，并导致膜的融合。据此，植物的配子在受精作用中可能存在表面决定因子的假设是合理的。当前对受精中配子融合的机制提出2种假说：随机假说(chance hypothesis)和特异受体假说(specific receptor hypothesis)。随机假说认为，精子与卵受精是随机结合，并且一个精细胞与卵结合后随即阻止其他精细胞入卵；特异受体假说认为，雌、雄配子融合是由特异的细胞表面分子所预定，两个精细胞表面质膜具有不同的决定因子，这种因子或是与卵细胞或是与中央细胞的表面互补。

在假定存在倾向受精的基础上，推导精卵识别可能存在3种模式：① 无特异性决定因子而随机融合；② 卵细胞特异性决定因子仅存在于能与它融合的雄配子上；③ 卵细胞特异性决定因子存在于一个精细胞上，而另一个精细胞上存在着中央细胞特异性决定因子。

精卵识别的2种假说哪一种是正确的，还需从精细胞的细胞学及分子生物学研究中去获得证据。特异受体假说的提出是以精子异型性的特征为基础，但可能起作用的识别机制与一对精细胞之间形态学的差异无关，而精细胞表面的分子差异是关键。20世纪90年代以来，应用分离的活精细胞和采用一系列的方法，主要是免疫学特征鉴定及多肽－蛋白质特征鉴定方法，已取得了一些有意义的结果。例如发现了单克隆抗体JIM能与油菜的精细胞和卵细胞结合，并特异地标记在膜上，但不与中央细胞结合；从麝香百合生殖细胞已得到一种专一性地与生殖细胞和精细胞的细胞质结合的特异性抗体LIG 62。

在配子融合时，雄配子的细胞质是否也同核一起进入雌配子？根据光镜观察到的现象，曾推测有2种可能：第一，融合时两个精子都脱掉细胞质；第二，与卵融合的精子是整个细胞而与中央细胞

融合的精子是裸核。电镜下的观察对精子细胞质是否参与融合能作出较确切的判断，但目前的资料十分贫乏。目前的研究资料显示，在配子融合时雄性细胞质的命运在不同植物中是不一样的。

精子的细胞质是否参与融合将影响到父系细胞质的遗传。在被子植物中，细胞器（质体和线粒体）的遗传存在不同方式。单亲母系遗传占优势，双亲遗传是少数，还有更少数的种是单亲父系遗传。导致单亲母系细胞器遗传的机制主要是由于雄性细胞在形成或发育过程中细胞器被排除或其DNA降解。单亲母系细胞质遗传方式也可能是由于配子融合时雄性细胞质的被排除。大麦、棉花、菠菜和加拿大杨的两个精子或一个精子（与卵融合的）的细胞质及其细胞器被排除在雌配子之外，雄性细胞质不传递至合子，这是单亲母系细胞质遗传的一种机制。相反，在遗传学上确定是双亲质体遗传的物种，例如红萼月见草（*Oenthera erythrosepela*），其合子中存在双亲的质体。在天竺葵受精后的卵细胞和中央细胞中，以及早期原胚及胚乳中，可以识别出既有雌性的也有雄性的质体和线粒体，这表明具双亲细胞质遗传型特征的物种，在配子融合时精细胞质参与融合，并传递到胚和胚乳中。

被子植物的受精作用是一个复杂的过程。整个过程在体内进行，不仅涉及配子本身，还与雄配子体和雌配子体的其他细胞有关，这些细胞影响着精细胞与卵细胞的接触和融合。利用离体技术，将配子置于离体控制的实验条件下研究受精的技术在20世纪80年代兴起，并迅速地得到发展。植物受精的体外模拟，将对受精机制的研究和在育种工作中作为组合不同基因组、创造新物种的途径有独特的价值；同时，与遗传操作和生物工程技术相结合，将开创受精工程的新领域。这些设想有的已成为现实。1990年Kranz等用玉米分离的精细胞和卵细胞在体外受精获得成功，并进一步使人工合子发育为能育植株。这被认为是被子植物双受精研究开创性的工作，促进了在离体情况下去探索一系列长期未解决的问题。配子的离体操作可能作为作物改良的一种有效途径。

参考文献

1 胡适宜．被子植物双受精发现100年：回顾与展望．植物学报，1998，40：1～13

2 许智宏．植物发育与生殖的研究：进展和展望．植物学报，1999，41：909～920

3 孙伟伟，陈永喆．FT及其相关基因对拟南芥开花的调控．见：李承森主编．植物科学进展（第三卷）．北京：高等教育出版社，2000．109～115

4 Bernier G. The control of floral evocation and morphogenesis. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1988, 39: 175～219

5 Coen E S, Carpenter R. The metamorphosis of flowers. Plant Cell, 1998, 5: 1 175～1 181

6 Devlin P F, Kay S A. Flower Arranging in Arabidopsis. Science, 2000, 288: 1 600～1 602

7 Guo H, Yang H, Mockder T C, *et al*. Regulation of flowering time by Arabidopsis photoreceptors. Science, 1998, 279: 1 360～1 363

8 Hardtke C S, Berleth T. The Arabidopsis gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. Embo J, 1998, 17: 1 045～1 411

9 Koornneef M, Alonso－Blanco C, Blankestijn de Vries H, *et al*. Genetic interactions among late－flowering mutants of Arabidopsis. Genetics, 1998, 148: 885～892

10 Levy Y Y, Dean C. Control of flowering time. Curr Opinion Plant Biol, 1998, 1: 49～54

11 Lotan T, Ohto M A, Yee K M, *et al*. Arabidopsis LEAFY COTYLEDON I is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. Cell, 1998, 93: 1 195～1 205

12 *Maheshwari* P. *An Introduction to the Embryology of Angiosperms*. New York: McGraw－Hill, 1950

13 Robert W M, Sablowski P, Meyerowitz E M. A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3/PISTILATA*. Cell, 1998, 92: 93～103

14 Samach A, Onouchi H, Gold S E, *et al*. Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of Arabidopsis. Science, 2000, 288: 1 613～1 616

15 Schneitz K. The molecular and genetic control of ovule development. Curr Opinion Plant Biol, 1999, 2: 13～17

16 Takashi A, *et al*. The flowering－time gene FT and regulation of flowering in Arabidopsis. J Plant Res, 1998, 111: 277～281

17 Wilhelmi L K, Preeuss D. The mating game: pollination and fertilization in flowering plants. Curr Opinion Plant Biol, 1999, 2: 18～22

18 Yasushi Kobayashi, Hidetaka Kaya, Koji Goto, *et al*. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. Science, 1999, 286: 1 960～1 962

索　　引

A

矮小(*runt*) 346
氨基多糖(glycosaminoglycans, GAGs) 205,295,304
暗区(area opaque) 78

B

叭喇狗(bulldog) 455
白膜(tunica albuginea) 334
白细胞介素 6(interleukin 6,IL-6) 117
白质(white matter) 213
斑点印迹(dot blotting) 379
斑胸草雀(zebra finch) 437
半变态(hemimetamorphosis) 308
半分生组织(semimeristem) 476
包被层(enveloping layer,EVL) 69
孢子(zooid) 11
胞囊(cyst) 26
胞质定域(cytoplasmic localization) 128
胞质隔离(cytoplasmic segregation) 124,128
胞质决定子(cytoplasmic determinant) 125,146
胞质区域化(cytoplasmic regionalization) 128
胞质图式(cytoplasmic pattern) 74
胞质重排(cytoplasmic rearrangement) 128
保幼激素(juvenile hormone) 312
背部化(dorsalize) 179
背部化决定子(dorsalizing determinants) 157
背侧部途径(dorsolateral pathway) 224
背侧铰合点(dorsolateral hinge point,DLHP) 94
背-腹(dorsal-ventral,D-V) 255
背腹系统 (dorsoventral system) 166
背-腹轴(dorsal-ventral axis) 4,164
背根神经(*dorsal root nerve*) 221
背特性(ventralization) 485
苯妥英(phenytoin) 442

边缘层(marginal zone)　213
边缘嵌合体(mericlinal chimeras)　477
边缘细胞(border cell)　26
编码(code)　266
变态(metamorphosis)　307,427
变态顶峰期(metamorphic climax)　318
变态期(metamorphogenesis)　369
变态蜕皮(metamorphic molt)　308
变形再生(morphallaxis)　269
表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)　329
表皮栓(epidermal plug)　100
表型(phenotype)　7
表型可塑性(phenotypic plasticity)　432
玻璃海鞘(*Ciona*)　139
玻璃体(vitreous body)　283
不分节中胚层(unsegmented mesoderm)　101
不完全变态(incomplete metamorphosis)　308
不相称蛋白(inappropriate protein)　102

C

蚕蛾(*Bombyx mori*)　431
侧板中胚层(lateral plate mesoderm)　106
侧面抑制作用(lateral inhibition)　209
侧膝状核(lateral genicular nucleus)　246
层粘连蛋白(laminin)　196,225
插入的再生(intercalary regeneration)　273
插入规则(intercalation rule)　275
插入混合(intercalation 或 interdigitation)　77
长腕幼虫(pluteus)　146
长腕幼虫无效 DNA (pluteus - null DNA)　401
常染色质(euchromatin)　372
超数附肢(supernumerary limb)　254
超氧化物自由基(superoxide radical)　443
撤消(withdrawal)　236
成胞囊细胞(cytoblast)　26
成虫盘(imaginal discs)　308,362
成虫蜕皮(imaginal molt)　308
成对控制基因(pair - rule gene)　166,174
成红细胞(erythroblast)　117
成花决定状态(florally determined state)　482
成肌细胞(myoblast)　102
成神经细胞(neuroblast)　217

成纤维细胞生长因子－2(fibroblast growth factor 2,FGF－2) 257
成形素(morphogen) 125
成血管细胞(angioblast) 111
成组织细胞(histoblasts) 308
臭菘(*Veratrum californicum*) 440
初级感受性(primary competence) 191
初级精母细胞(primany spermatocyte) 18
初级卵母细胞(primary oocyte) 22
初级胚胎诱导(primary embryonic induction) 156,189
初级神经胚形成(primary neurulation) 91
初级微绒毛(primary villi) 87
初级下胚层(primary hypoblast) 78
初级性别决定(primary sex determination) 337
初生分生组织(primary meristem) 476
锄足蟾(*Scaphiopus couchii*) 435
触角足复合体(antennapedia complex,Antp－C) 176
触向性(stereotropism) 234
触须(palp) 125
传出(efferent) 217
传入(afferent) 217
船蛆(*Teredo navalis*) 428
创伤愈合(wound healing) 269
春化促进途径(vernalization promotion pathway) 481
纯合的(homozygous) 334
雌性化开关基因(feminizing switch gene) 345
雌性生殖单位(female germ unit) 488
雌性先熟(protogynous) 352
雌雄嵌合体(gynandromorphs) 344
雌雄同体(hermaphroditism) 350
雌雄异体(gonochoristic) 352
雌蚁(gyne) 433
次级感受性(secondary competence) 191
次级精母细胞(secondary spermatocyte) 19
次级卵母细胞(secondary oocyte) 22
次级内陷(secondary invagination) 74
次级神经胚形成(secondary neurulation) 91
次级微绒毛(secondary villi) 87
次级下胚层(secondary hypoblast) 78
次级性别决定(secondary sex determination) 337
次级诱导(secondary induction) 162,196
次级诱导者(secondary inductor) 196
次生胚胎(secondary embryo) 157

次生胚轴(secondary axis) 75
次生原肠(secondary archenteron) 149
促成熟因子(maturation promoting factor,MPF) 24,32
促红细胞生成素(erythropoietin) 116
促激素(tropic hormone) 330
促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone,TSH) 321
促甲状腺素释放激素(thyrotropin - releasing hormone,TRH) 321
促卵泡激素(follicle - stimulating hormone,FSH) 28,330
促前胸腺激素(prothoracicotropic hormone,PTTH) 313,432
促性腺激素(gonadotropin) 331
促性腺素释放激素(gonadotropin - releasing hormone,GnRH) 330
催乳激素(prolactin) 321

D

大裂球(macromere) 132
大脑皮层(cerebral cortex) 217
单倍体(haploid) 6
单纯疱疹病毒(*Herpes siplex*) 443
单拷贝 DNA(single - copy DNA) 401
单眼损伤(monocular deprivation) 439
担轮幼虫(trochophore larva) 130
灯刷染色体(lampbrush chromosome) 376
等位基因(alleles) 349
等位排斥(allelic exclusion) 404
第二极体(second polar body) 22
第二斜肌(oblique muscle) 310
第一极体(first polar body) 22
凋亡(apoptosis) 460
调整型发育(regulative development) 6,124,287
顶表皮帽(apical epidermal cap) 269
顶体(acrosome) 19
顶外胚层保持因子(apical ectodermal maintenance factor) 254
顶外胚层嵴(apical ectodermal ridge, AER) 252
定时自动摄影术(time - lapse film) 64
定型(commitment) 123
动脉干(truncus arteriosus) 109
动物极化(animalization) 148
动物极极帽(animal cap) 77,158
独眼畸形(cyclopia) 440
端脑(telecephalon) 97
多点内陷小岛(polyinvagination island) 78
多极神经元(multipolar neurons) 216

多聚核糖体(polyribosome) 412
多氯联苯胺(polychlorinated biphenyls,PCBs) 444
多能性(pluripotentiality) 226
多能造血干细胞(pluripotential hematopoietic stem cell) 115
多潜能细胞(pluripotent cell) 357
多线染色体(polytene chromosome) 314,361
多因子模型(multifactorial model) 480
多指(polydactylous) 265

E

E-细胞选择蛋白(E-cadherin) 83
额鼻突(frontonasal process) 442
额外真皮组织(extra hypodermal tissue) 135
鳄龟(snapping turtle) 353
二倍体(diploid) 6
二恶英(dioxin) 443
二乙基己烯雌酚(DES) 444

F

发光细菌(*Vibrio fischeri*) 429
发生机械学(developmental mechanics) 146
发育(development) 1
发育成熟度(developmental maturity) 81
发育共生(developmental symbiosis) 429
发育生理学(developmental physiology) 147
发育生物学(developmental biology) 1
发育制约(developmental constraint) 455
繁殖(reproduction) 3
反式激活结构域(transactivation domain) 394
反应规范(reaction norm) 432
反应能力(competence) 162
反应组织(responding tissue) 189,191
返幼现象(rejuvenation) 310
返祖结构(atavistic structure) 461
芳构化酶(aromatase) 339
放线菌素 D(actinomycin D) 139
非遗传多型性(polyphenism) 432
分层(delamination) 62
分化(differentiation) 3
分化细胞(differentiated cell) 357
分离(dissociation) 451
分离实验(isolation experiment) 146

分裂球(blastomeres) 4
"分母成分"(denominator elements) 346
分散因子(scatter factor) 82
分生组织(meristem) 476
分生组织特征基因(meristem identify gene) 480
分子层(molecular layer) 219
跗节(tarsus) 308
辐射纤维(radial fiber) 213
负的(negative) 264
附肢(limb) 250
附肢场(limb field) 251
附肢盘(limb disc) 251
附肢芽(limb bud) 250
附肢域(limb field) 264
副蛔虫(*Parascaris aequorum*) 133
副交感(parasympathetic) 220
副体节(parasegment) 172,450
副王蛱蝶(viceroy butterfly) 434
腹侧途径(ventral pathway) 224
腹块(belly piece) 153
腹特性(dorsalization) 485

G

干扰作用(disruption) 440
感觉神经节(sensory ganglion) 221
感觉损伤(sensory deprivation) 438
感受性 (competence) 189
感受性(competence) 191
睾酮(testosterone) 335
睾丸间质细胞(Leydig's cell) 334
睾丸决定因子(testis－determining factor,TDF) 337
睾丸网(rete testis) 334
个体发育(ontogeny) 1
供养血管(feeding vessel) 113
巩膜(sclera) 283
共生的(symbiotic) 354
钩介幼虫(glochidium) 447
孤雌生殖(parthenogenetic) 22
骨发生(osteogenesis) 104
骨骼形成间质细胞(skeletonogenic mesenchyme) 65
骨膜(periosteum) 105
骨髓(bone marrow) 160

骨髓栓(plugs of bone marrow) 117
骨细胞(osteocyte) 105
骨形成蛋白(bone morphogenetic protein,BMP) 182
骨质疏松(menopausal osteoporosis) 117
固着细胞(anchor cell) 209
关联发育(correlated progression) 455
管状鼻(proboscis) 354
光蝉(planthopper) 432
光周期促进途径(photoperiodic promotion pathway) 480
龟甲轮虫(*Keratella slacki*) 434
过度刺激(overstimulation) 345
过度增生(overproliferation) 236

H

海豹肢畸形(phocomelia) 441
寒武纪(Cambrian period) 448
毫毛(vellus) 100
合胞体胚盘(syncytial blastoderm) 27
合胞体滋养层(syncytiotrophoblast) 86
合子(zygote) 1,11
和谐等能系统(harmonious equipotential system) 147
河豚毒素(tetrodotoxin,TTX) 291
核决定子(nuclear determinant) 144
核克隆(nuclear cloning) 364
核酸分子杂交(nucleic acid hybridization) 362
核团(nucleus) 220
黑脉金斑蝶(monarch butterfly) 434
亨氏结(Hensen's node) 79,157
红鲍(*Haliotis rufescens*) 428
红细胞(erythrocyte) 117
虹膜(iris) 283
喉气管沟(laryngotracheal groove) 119
骺生长板(epiphyseal growth plate) 106
后成论(theory of epigenesis) 5
后端化(posteriorization) 266
后端化信号(posteriorizing signal) 160
后端化因子(posteriorizing factor) 184
后端系统 (posterior system) 166
后坏死区(posterior necrotic zone) 269
后脑(metencephalon) 97
化学亲和性(chemoaffinity) 289
化学亲和性假说(the chemoaffinity hypothesis) 241

还原病毒(retrovirus) 266
环管(ring canal) 140
环节动物(annelids) 126
黄色新月区(yellow crescent) 125
黄体生成素(luteinizing hormone, LH) 28,330
灰色树蛙(*Hyla chrysoscelis*) 435
灰色新月区(gray crescent) 125
灰质(grey matter) 213
回路(circuity) 217
活化(activation) 317
获能(capacitation) 33

J

机械模型(mechanical model) 144
肌管(myotube) 102
肌腱蛋白(tenascin) 225
肌节(myotome) 102
肌母细胞决定子 1(myoblast determination 1) 383
肌肉决定子(muscle - forming determinant) 145
肌质(myoplasm) 125
基板(basal lamina) 206
基本分生组织(general meristem) 476
基层(basal layer) 98
基底膜(basement membrane) 99
基节(coxa) 308
基因扩增(gene amplification) 369
基因型(genotype) 6
基因重排(gene rearrangement) 367
基因组相同(genome eqivalence) 361
基质(stroma) 283
基质黏着分子(substrate adhesion molecule, SAM) 228
畸形(malformation) 439
畸形学(teratology) 440
激活(activation) 160
激素(hormone) 307
激素结合结构域(hormone - binding domain) 394
激素效应元件(hormone - responsive elements) 394
激素原(prohormone) 313
吉普塞蛾(*Lymantia dispar*) 431
极化活动区(zone of polarizing activity, ZPA) 260
极粒(polar granule) 137
极粒组分(polar granule component, Pgc) 141

极细胞(pole cell) 137
极性坐标模型(polar coordinate model) 262,273
极叶(polar lobe) 130
极质(pole plasm) 137
棘层(spinous layer) 98
集中延伸(convergent extension) 66
脊神经(spinal nerve) 221
脊髓裂(spina bifida) 94
脊索神经铰合(chordoneural hinge) 96
脊索中胚层(chordamesoderm) 71
脊柱前突(lordosis) 344
记忆细胞(memory cell) 436
家系相关基因(genealogically - related gene) 459
甲氨喋呤(methotrexate) 442
甲胺酰磷酸盐合成酶(carbamylphosphate synthetase) 326
甲状腺素(thyroxine, T_4) 321
假单极神经元(pseudounipolar neuron) 216
间脑(diencephalon) 97
间性的形式(intermediate form) 354
兼性的(faculative) 430
兼性型异染色质(facultative heterochromatin) 372
减数分裂(meiosis) 15
检查点(check point) 60
简单变态(simple metamorphosis) 308
碱性磷酸酶(alkaline phosphotase) 129
建群(colonization) 429
渐进带(progress zone) 253
渐进特化(progressive specification) 124
浆细胞(plasma cell) 436
交感(sympathetic) 220
交感神经节(sympathetic ganglion) 221
胶原(collagen) 225,295
角贝(*Dentalium vulgare*) 132
角蛋白(keratin) 197,320
角膜(cornea) 283
角膜诱导(cornea induction) 303
角皮(cuticle) 164,308
角质层(cornified layer 或 stratum corneum) 98
角质细胞(kenatinocytes) 98
角质细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF) 99
节后神经纤维(postganglionic fiber) 221
节前神经纤维(preganglionic fiber) 221

结合素(bindin) 458
睫状体(ciliary body) 283
睫状体神经节(ciliary ganglion) 221
截桩(stump) 269
解离(dissociation) 193
金丝雀(canary) 438
紧密化(compaction) 49
紧密胎盘(contact placenta) 87
近－远(proximal－distal, P－D) 255
近轴细胞(adaxial cell) 71
进化发育生物学(evolutionary developmental biology) 464
晶囊轮虫(*Asplanchna*) 434
晶状体板(lens placode) 283
晶状体蛋白(crystallins) 298
晶状体泡(lens vesicle) 283
晶状体窝(lens pit) 283
精巢(testis) 334
精卵识别(recognition of egg and sperm) 35
精囊(seminal vesicle) 337
精确化(refinement) 291
精小管(seminiferous tubele) 334
精原细胞 A1(type A1 spermatogonium) 18
精子(sperm) 3
精子发生(spermatogenesis) 17
精子细胞(spermatid) 19
静脉窦(sinus venosus) 109
静止中心 (quiescent center, QC) 478
酒精中毒综合征(fetal alcohol syndrome, FAS) 442
局部地域有序投射(topographically ordered projection) 240
决定(determination) 123,212
决定子(determinant) 6

K

"开关基因"(switch gene) 383
开花抑制途径(floral repression pathway) 480
抗睾丸酮(antitestosterone) 443
抗缪勒氏管激素(anti-Müllerian duct hormone, AMH) 337,341
抗神经化蛋白因子(anti-neuralizing protein) 183
抗抑郁剂(antidepressant) 442
颗粒层(granular layer) 98
克隆选择假说(clonal selection hypothesis) 436
口板(oral plate) 118

奎宁(quinine) 440

L

辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 237
蓝鹅(blue goose) 449
蓝隆头鱼(blue - headed wrasse) 434
篮状细胞(basket cell) 219
酪氨酸激酶受体 (receptor tyrosine kinase, RTK) 169
类骨质(osteoid) 104
类固醇(steroid) 336
类坏死(paranecrosis) 304
类型转换(class switching) 367,395
鲤鱼(*Carassius carassius*) 435
荔枝螺(*Thais lamellosa*) 435
β - 连环蛋白(β - catenin) 83
连接表皮(adjoining epidermis) 308
邻近组织的相互作用(proximate tissue interaction) 196
临界日长(critical day length) 430
菱唇(rhombic lip) 218
菱脑(rhombencephalon) 97
菱脑节(rhombomere) 224
龄虫(instars) 308
硫酸蛋白多糖(sulfated proteoglycans) 65
硫酸化葡糖醛酸(glucuronic acid,HNK - 1) 82
硫酸软骨素蛋白多糖(chondroitin sulfate proteoglycan,CSPG) 66
颅颊囊(Rathke's pocket) 118
卵(ova) 335
卵巢(ovary) 334
卵巢管(ovariole) 26
卵黄导管(yolk duct) 108
卵黄合胞体层(yolk syncytical layer,YSL) 69
卵黄静脉(vitelline veins) 108
卵黄囊(yolk sac) 78,107
卵黄囊内胚层(yolk sac endoderm) 84
卵精巢(ovotestis) 16
卵块(egg mass) 429
卵裂(cleavage) 3,45
卵膜(chorion membrane) 107
卵泡(follicle) 336
卵泡膜细胞(thecal cell) 336
卵室(egg chamber) 26
卵原细胞(oogonia) 22

卵轴(egg axis) 23
卵子(ovum) 3,22
卵子发生(oogenesis) 21
卵子发育神经分泌激素(egg development neurosecretory hormone,EDNH) 429
络合(complexed) 348

M

马尔皮基层(Malpighian layer) 98
马蛔虫(*Ascaris megalocephala*) 133
马拉维蝴蝶(*Bicyclus anymana*) 433
脉络膜(choriod) 283
毛干(hair shaft) 100
帽贝(*Patella coerulea*) 130
梅毒(syphilis) 443
朦胧子(nuage) 137
面盘(velum) 132
明区(area pellucida) 78
缪勒氏管(Müllerian duct) 336
模块化(modularity) 451
膜内骨化(intramembranous ossification) 104
末端系统 (terminal system) 166
母体效应基因(maternal - effect gene) 12,26
母体效应因子(maternal - effect factor) 413
母源性因子(maternal factor) 135

N

Nieuwkoop 中心(Nieuwkoop center) 157,179
内部肌肉(intrinsic muscles) 283
内共生体(endosymbiont) 429
内含子(intron) 347,384
内角膜(inner cornea) 303
内卷(involution) 62
内卷缘区细胞(deep involuting marginal zone cell) 77
内颗粒层(internal granule layer) 218
内胚层(endoderm) 4
内细胞团(inner - cell mass) 49
内陷(invagination) 62
内移(ingression) 62
内脏神经系统(visceral nervous system) 220
内中胚层(endomesoderm) 68
男性化(masculinization) 341
囊胚(blastula) 4

囊胚期无效 DNA(blastula－null DNA) 401
囊胚中期转换(midblastula transition,MBT) 389
脑神经(cranial nerve) 221
拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 470
尿囊(allantois) 107
尿素循环(urea cycle) 320
尿殖突起(urogenital swellings) 341

O

欧洲地图蝶(*Araschnia levana*) 432

P

POU 蛋白(POU protein) 391
排氨的(ammonotelic) 320
排卵(ovulation) 28
排卵对(spawning pairs) 352
排尿的(ureotelic) 320
胚盾(embryonic shield) 71
胚环(germ ring) 70
胚孔(blastopore) 66
胚盘(blastodisc) 78
胚皮(periderm) 98
胚胎(embryo) 1
胚胎发育(embryogenesis) 3
胚胎干细胞(embryonic stem cell) 50
胚胎外膜(extraembryonic membrane) 78
胚胎学(embryology) 1
胚胎诱导(embryonic induction) 144,189
胚外组织(extraembryonic tissue) 86
胚下腔(subgerminal cavity) 78
胚轴(embryonic axes) 4,164
胚状植物体(embryonic plant) 469
配体(ligand) 458
配子(gamete) 3,4,11
配子发生(gametogenesis) 4
皮层板(cortical plate) 217
皮脂(sebum) 100
皮脂腺(sebaceous gland) 100
皮质生殖索(cortical sex cord) 335
片层(sheet) 77
偏侧效应(lateralizing effect) 462
嘌呤霉素(puromycin) 140

平衡棒(haltere) 308
瓶状细胞(bottle cell) 72
破骨细胞(osteoclasts) 106
浦肯野细胞(Purkinje cell) 217

Q

脐带(umbilical cord) 87
脐动脉(umbilical artery) 113
脐静脉(umbilical vein) 113
器官特征基因(organ identity gene) 483
器官形成(organogenesis) 3,91
迁移(migration) 212
前变态期(prometamor phosis) 318
前成红细胞(proerythroblast) 117
前端系统 (anterior system) 165
前骨质(prebone) 104
前－后(anterior－posterior, A－P) 255
前－后轴(anterior－posterior axis) 4,164
前坏死区(anterior necrotic zone) 269
前列腺(prostate) 337
前脑(prosencephalon) 97
前体细胞(procursor cell) 208
前胸腺(prothoracic gland 或 ecdysial gland) 312
潜能(potency) 191
嵌合体(chimeras) 477
嵌合小鼠(chimeric mouse) 102
嵌合型发育(mosaic development) 6
20－羟基蜕皮激素(20－hydroxyecdysone) 309,432
青春期(puberty) 328
求偶(courtship) 350
球海绵体肌(bulbocavernosus) 342
去分化(dedifferentiation) 270,302
去活化(deactivation) 317
全变态(holometamorphosis) 308
全能细胞(totipotent cell) 357
全能性(totipotency) 470
缺口基因(gap gene) 166,172
缺损实验(defect experiment) 146
群落刺激因子(colony－stimulating factor, M－CSF) 117
群落形成单元(colony－forming unit) 115

R

染色体消减(chromosome diminution) 134

染色体胀泡(chromosome puff) 376
染色质(chromatin) 372
染色质消减(chromosome diminution) 366
热力污染(thermal pollution) 433
人中(philtrum) 442
壬基酚(*p* - nonylphenol) 444
妊娠期(pregnancy) 331
绒毛膜(chorion) 87
绒毛膜促性腺激素(chorionic gonadotropin) 88
绒毛膜催乳激素(chorionic somatomammotropin) 88
绒膜尿囊膜(chorioallantoic membrane) 107
容许的相互作用(permissive interaction) 196
溶素蛋白(lysin protein) 459
蝾螈(*Triturus taeniatus*) 152
融素(meltrin) 104
鞣酸(tannin) 432
蠕动(peristalsis) 118
乳腺(mammary gland) 337
乳腺嵴(mammary ridge) 328
乳腺索(mammry cord) 328
乳腺芽基(mammary bud) 328
软骨发生(chondrogenesis) 105
软骨内骨化(endochondral ossification) 104
软体动物(molluscs) 126
蚋(blackfly) 428
若虫 (nymph) 308

S

Spemann - Mangold 组织者(Spemann - Mangold organizer) 157
鳃上基板(epibranchial placode) 227
三碘甲腺原氨酸(triiodothyronine, T_3) 321
三级微绒毛(tertiary villi) 87
三级诱导(tertiary induction) 196
三级诱导者(tertiary inductor) 196
三叶期(trefoil stage) 130
色素视网膜(pigmented retina) 283
色素体(melanosome) 98
杀虫剂(pesticide) 443
上橄榄核(olive) 239
上胚层(epiblast) 70
上阴道(upper vagina) 336
少突胶质细胞(aligodendrocyte) 216

神经板(neural plate) 92
神经肠管(neurenteric canal) 67,96
神经递质(neurotransmitter) 217
神经感受性(neural competence) 191
神经沟(neural groove) 92
神经管(neural tube) 4
神经化因子(neuralizing factor) 193
神经胶质生长因子(glial growth factor) 273
神经胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP) 215
神经节(ganglion) 221
神经节母细胞(ganglion mother cell) 138
神经节细胞(ganglion cells) 286
神经龙骨(neural keel) 71
神经胚(neurula) 91
神经胚形成(neurulation) 3,91
神经上皮(neuro epithelium) 212
神经生长因子(nerve growth factor,NGF) 230
神经视网膜(neural retina) 283
神经突起(neurite) 232
神经细胞黏着分子(neural cell adhesion molecule,NCAM) 405
神经营养蛋白 3(neurotrophin 3,NT-3) 102
神经诱导(neural induction) 189
神经褶(neural fold) 92
肾上腺素能的(adrenergic) 217
肾上腺髓质(adrenal medulla) 224
生长(growth) 3
生长锥(growth cone) 232,290
生发层(stratum germinativum) 98
生发泡破裂(germinal vesicle breakdown) 32
生骨节(sclerotome) 102
生活周期(life cycle) 11
生皮肌节(dermamyotome) 102
生皮节(dermatome) 102
生态演替(ecological succession) 429
生殖道(genital tract) 350
生殖发育(reproductive development) 480
生殖嵴(genital ridge) 11
生殖力(fecundity) 433
生殖盘(genital disc) 308
生殖索(sex cords) 334
生殖索网(sex cord) 334
生殖细胞(germ cell) 4,11,334

生殖腺原基(genital anlage) 11
生殖新月(germinal crescent) 14,80
生殖质(germ plasm) 4,11,134
施万细胞(Schwann cell) 217
视杯(optic cup) 283
视柄(optic stalk) 283
视蛋白(opsin) 319
视顶盖(optic tectum) 288
视杆(rods) 286
视黄酸(retinoic acid) 262
视交叉(chiasm) 288
视泡(optic vesicle) 283
视乳突(optic disk) 283
视神经(optic nerve) 283
视神经交叉(optical chiasm) 438
视束(optic tract) 289
视网膜顶盖投射(retinotectal projection) 288
视锥(cones) 286
视紫红质(rhodopsin) 319
视紫质(prophyropsin) 319
室层(ventricular zone) 217
室管膜层(ependymal layer) 217
室管膜腔(ependymal canal) 96
室管膜细胞(ependymal cell) 213
适合度(fitness) 434
受精(fertilization) 3,32
受精促进肽(fertilization promoting peptide ,FPP) 35
受精卵(fertilized egg) 1
受精卵(zygote) 337
受精素(fertilin) 104
输出管(efferent duct) 334
输精管(vas deferen) 334
输卵管(oviduct) 336
输尿管芽(ureteric bud) 456
树突 (dentrite) 213
树状分支(abors) 291
衰老(aging) 3
双倍(eudi plodia) 255
双极神经元(bipolar neuron) 216
双性基因(*doublesex* ,*dsx*) 345
双胸复合体(bithorax complex ,BX－C) 176
水俣病(Minamata disease) 440

水蚤(*Daphnia*)　434
水蛭(*Clepsine*)　125
随机假说(chance hypothesis)　489
随机失活(random inativation)　373
髓核(nuclei pulposi)　102
髓脑(myelencephalon)　97
髓鞘(meylin sheath)　216
髓索(medullary cord)　96
梭鱼(pike)　435
索前板(prechordal plate)　285
索状合胞体(syncytial cable)　64

T

胎儿酒精效应(fetal alcohol effect)　442
胎儿皮脂(vernix caseosa)　100
胎毛(lanugo)　100
胎盘(placenta)　84
胎盘催乳素(placental lactogen)　88
唐氏先天愚症(Down's syndrome)　440
糖蛋白(proteoglycan)　226
糖皮质激素(glucocorticoid)　227
特化(specification)　123
特异受体假说(specific receptor hypothesis)　489
提肛肌(levator ani)　342
体壁层(somatopleure)　107
体节板(segmental plate)　101
体节极性基因(segment polarity gene)　166,175
体节小体(somitomere)　101
体节形成(segmentation)　4
体节中胚层(somatic mesoderm)　106
体神经系统(somatic nervous system)　220
体外的(*in vitro*)　263
体细胞(somatic cell)　4,11,145
体褶(body fold)　106
天敌诱导防御(predator - induced defense)　434
添加上皮细胞(adepithelial cell)　308
听基板(otic placode)　227,286
听泡(otic vesicle)　227
听窝(otic pit)　227
同步的(synchronous)　352
同等型(isoform)　20
同工酶(isozyme)　104

同源发育途径(homologous developmental pathway) 462
同源异形复合体(homeotic gene complex,HOM－C) 176
同源异型基因(homeotic gene) 166,391
同源异型结构域(homeodomain) 178,391
同源异型框(homeobox) 178
同源异型框蛋白(homeobox protein) 391
同源异型框基因(homeobox gene) 178,391
同源异型现象(homeosis) 391
同源异型选择者基因(homeotic selector gene) 176
5α－酮类固醇还原酶(5α－ketosteroid reductase) 341
瞳孔(pupil) 285
头突(head process) 81
透明质酸(hyaluronic acid) 226
突触(synapses) 216
突触后电位(postsynaptic potential, PSP) 245
图式形成(pattern formation) 4,164
团藻(*Volvocaceans*) 447
蜕皮(molt) 307
蜕皮激素(ecdysone 或 molting hormone) 312
蜕皮激素受体(ecdysone receptor,EcR) 315
豚鼠(guinea pig) 160
拖鞋样蜗牛(slipper snail) 354
脱落胎盘(deciduous placenta) 87
唾液腺(salivary gland) 199

W

外包(epiboly) 62
外侧膝状核(lateral geniculate nucleus) 438
外角膜(outer cornea) 303
外颗粒层(external granule layer) 218
外囊(outpocket) 118
外胚层(ectoderm) 4
外胚层板(ectodermal placode) 227
外生殖器(external genitalia) 341
外套层(mantle layer) 213
外显子(exon) 347,384
外眼肌(extrinsic ocular muscles) 285
弯曲素(flectin) 110
网柱菌(*Dictyistelids*) 447
网状细胞(reticulocyte) 117
微管(microtubule) 295
微棘(microspike) 233

微丝(microfilament) 129,295
尾端化因子(caudalizing factor) 184
尾芽(tailbud) 96
未分化时期(indifferent stage) 334
位点控制区(locus control region,LCR) 382
位置信息(positional information) 65
温度敏感(*temperature - sensitive*,*ts*) 349
乌尔夫氏管(Wolffian duct) 334
乌尔夫氏嵴(Wolffian ridge) 252
乌鹀(*Euprymna scolopes*) 429
无表情(*deadpan*) 346
无翅(wingless) 255
无虹膜(aniridia) 439
无脑畸形(anencephaly) 95
无女(*daughterless*;*da*) 346
无血管的区域(avascular sleeve) 263
无肢(*limbless*) 265
无姊妹 - *a*(*sisterless - a*,*sis - a*) 345
无姊妹 - *b*(*sisterless - b*,*sis - b*) 345
戊基酚(4 - tertpentylphenol) 444
物种形成(speciation) 459

X

吸水分子(hygroscopic molecule) 66
吸血虫(*Rhodinus prolixus*) 429
系统发生(systematics development) 1
系统发生型阶段(phylotypic stage) 456
细胞表型(cell phenotype) 357
细胞凋亡(apoptosis) 229
细胞定型(commitment) 313
细胞分化(cell differentiation) 1,4,123,357
细胞分裂素(cytokine) 115
细胞核 RNA(nuclear RNA, nRNA) 399
细胞核分裂(karyokinesis) 129
细胞静止因子(cytostatic factor,CSF) 60
细胞黏着分子(cell adhesion molecule, CAM) 228
细胞视黄醇结合蛋白质 I(cellular retinal binding protein I,CRBPI) 269
细胞松弛素 B(cytochalasin B) 129
细胞外基质(extracellular matrix,ECM) 295
细胞质分裂(cytokinesis) 129
细胞周期蛋白(cyclin) 24
细胞滋养层(cytotrophoblast) 86

下胚层(hypoblast) 70
先成论(theory of preformation) 5
先驱神经纤维(pioneer nerve fiber) 234
先天畸形(congenital malformation) 440
纤连蛋白(fibronectin) 64,196,225
纤维性(fibrous) 337
线虫(nematodes) 126
线状伪足(filopdia) 64
腺苷酸环化酶(adenylate cyclase) 327
相互的诱导作用(reciprocal induction) 201
镶嵌理论(mosaic theory) 144
镶嵌体(chimera) 93
镶嵌型发育(mosaic development) 124
向电性(galvanotropism) 235
向化性(chemotropism) 235
小脑(cerebellum) 97
小脑板(cerebellar plate) 218
小脑皮层(cerebellar cortex) 217
小生境(microhabitat) 432
小眼(ommatidia) 207,459
协同选择(co-option) 451
泄殖窦(sinus) 341
泄殖腔(urethra) 334
心包腔(pericardial cavity) 108
心房区(atrial region) 109
心肌外膜(epimyocardium) 108
心内膜(endocardium) 108
心内膜垫(endocardial cushion) 110
心脏断裂(cardia bifida) 108
心脏特异性同源框(cardiac - specific homeobox, *Csx*) 460
心脏形成细胞(cardiogenic cell) 108
新皮层(neopallial cortex) 217
新纹状体(hyperstriatum) 437
信号传导(signaling) 359
星形细胞(stellate cell) 219
形态发生(morphogenesis) 3
形态发生沟(morphogenetic furrow) 459
形态发生决定子(morphogenetic determinant) 125
形态发生素(morphogen) 166
形体模式(body plan) 4,164,448
性别表现型(sexual phenotype) 334
性别梳(sex combs) 349

性别－致死基因(*sex－lethal*, *Sxl*) 344
性别转换基因(*transfomer*, *tra*) 344
性别转换基因－2(*tra－2*) 345
性激素(sex hormone) 331
性细胞初期发育(progenesis) 451
性腺(gonad) 334
雄激素不敏感综合征(androgen insensitivity syndrome) 328,341
雄性生殖单位(male germ unit) 487
雄性先熟(protandrous) 352
须鲸(baleen whale) 446
嗅基板(nasal placode) 227
嗅窝(alfactory pit) 228
雪鹅(snow goose) 449
血岛(blood island) 112
血管化(vascularization) 112
血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 112
血管生长(angiogenesis) 112
血管生成素(angiopoietin－1) 112
血管形成(vasculogenesis) 111
血细胞生成细胞(hemangioblast) 112
血液决定子(blood－forming determinant) 145

Y

亚成虫(subimago) 308
亚室管膜层(subependymal zone) 217
亚细胞因子(subcelluar factor) 75
咽(pharynx) 118
咽侧体(corpora allata) 311,429
咽侧体(corpus allatum) 312
咽弓(pharyngeal arches) 118
咽囊(pharyngeal pouches) 118
咽神经胚(pharyngula) 456
延髓(medulla oblongata) 97
眼优势柱(ocular dominance column) 246
羊膜(amnion) 107
羊水(amniotic fluid) 84
叶蝉(*Euscelis incisus*) 429
叶酸(folate) 95
伊万斯蓝(Evans blue) 150
依赖型发育(dependent development) 155
依赖型特化(dependent specification) 124
移码(frame shift) 338

遗传程序(genetic program) 1
乙酰胆碱能的(cholinergic) 217
乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE) 128
异染色质(heterochromatin) 372
异染色质化(heterochromatization) 372
异时性(heterochrony) 451
异速生长(allometry) 452
异雄核受精(hetero－fertilization) 489
异源诱导者(heterogeneous inductor) 193
异质性(heterogeneity) 316
异质性核 RNA(heterogeneous nuclear RNA, hnRNA) 399
易感期(susceptibility) 441
翼状方软骨(pterygoquadrate cartilage) 461
阴道盲囊(blind vaginal pounch) 341
阴蒂(clitoris) 341
阴茎(penis) 337
阴门前体细胞(vulval procursor cell) 209
阴囊(scrotum) 341
银屑病(psoriasis) 99
营养因子(trophic factor) 273
蛹(pupa) 308
蛹化(pupation) 308
蛹期(pupal stage) 308
有条件特化(conditional specification) 124
右侧决定子(right determinant) 145
幼虫期(larval stage) 307
幼态成熟(neoteny) 451
诱导(induction) 6
诱导造血微环境(hematopoietic inductive microenvironment, HIM) 117
诱导者(inductor) 6, 189
与开花时间有关的基因(flowering time gene) 480
羽化(eclosion) 308
羽毛芽基(feather germ) 204
预定附肢区(prospective limb area) 251
预定命运(prospective fate) 147
预期潜能(prospective potency) 147
阈值的概念(threshold concept) 326
原变态(prometamorphosis) 307
原肠(archenteron or primitive gut) 66
原肠胚形成(gastrulation) 3
原分生组织(promeristem) 476
原沟(primtive groove) 79

原基(anlage) 4,124
原结(primitive knot) 79
原口(stomodeum) 118
原脑组织(archencephalic tissue) 160
原生殖细胞(primordial germ cell) 11
原始细胞(initials) 476
原条(primitive streak) 78,157
原位杂交(*in situ* hybridization) 362,380
原纹状体(archistriatum) 437
原窝(primitive pit) 79
缘区(marginal zone) 73
远端化规则(distalization rule) 276
远端细胞(distal tip cell) 16
远端转变的规律(rule of distal transformation) 273
月经(menarche) 330
孕酮(progesterone) 88

Z

ZPA 可扩散形态发生子模型(ZPA diffusible morphogen model) 261
杂二聚体(heterodimer) 316,346
杂合(heterozygous) 373
再生芽基(regeneration blastema) 270
脏壁层(splanchnopleure) 107
脏壁中胚层(splanchnic mesoderm) 106
早熟素(precocenes) 317
增殖(proliferation) 212
增殖上皮(germinal epithelium) 212
增殖素(proliferin,PLF) 113
增殖素相关蛋白(proliferin－related protein,PRD) 113
胀泡(puff) 314
罩翼目(Vestimentifera) 450
真皮乳突(dermal papilla) 100
整合膜蛋白(integral membrane protein) 351
整连蛋白(integrin) 99
整形(shaping) 93
正反馈(positive feedback) 321
正中隆起(medial eminence) 330
支持细胞(sertoli cell) 17,335
肢芽(limb bud) 252
脂肪体(fat body) 349
值(value) 274
植物发育生物学(plant developmental biology) 469

植物极后端胞质(posterior vegetal cytoplasm,PVC) 129
植物极化(vegetalization) 148
植物极化因子(vegetalizing factor) 193
植物极极帽(vegetal cap) 158
指令的相互作用(instructive interaction) 196
趾间坏死区(interdigital necrotic zone) 269
栉水母(ctenophores) 126
致畸因子(teratogen) 440
滞育(diapause) 313,430
滞育激素(diapause hormone) 431
稚虫(naiad) 308
中部坏死区(interior necrotic zone) 269
中侧轴(mediolateral axis) 77
中间层(intermediate layer) 213
中间基板(intermediate placode) 227
中间铰合点(median hinge point,MHP) 94
中间神经元(interneuron) 217
中内胚层细胞(mesentoblast) 132
中脑(mesencephalon) 97
中胚层(mesoderm) 4
中胚层带(mesodermal band) 77
中胚层感受性(mesodermal competence) 191
中胚层套膜(mesodermal mantle) 77,106
中期囊胚转换(midblastula transition,MBT) 69
中心体(centrosome) 135
中性基因(*intersex*, *ix*) 345
终末分支(terminal) 216
种系细胞(germ line cell) 210
种质学说(germ plasm theory) 144
重组酶(recombinase) 396
轴旁中胚层(paraxial mesoderm) 101
轴上肌(epaxial muscle) 102
轴突(axon) 213,215,283
轴突末梢(axonal terminals) 289
轴下肌(hypaxial muscle) 102
主调节基因(master regulatory gene) 176
主动脉(aorta) 109
贮备细胞(reserve cell) 271
专性的(obligatory) 430
转分化(transdifferentiation) 300
转化(transformation) 160
转化(metaplasia) 362

转化生长因子－α(transforming growth factor－α,TGF－α) 99
转决定(transdetermination) 362
转录抑制因子(transcription repressor) 169
转录因子(transcription factor) 390
转座子(transposon) 460
滋养层细胞(trophoblast cell) 84
子宫(uterus) 336
子宫颈(cervix) 336
子宫内膜(endometrium) 86
自分泌生长因子(autocrine growth factor) 99
自体受精(self-fertilization) 350
自主促进途径(autonomous promotion pathway) 480
自主神经系统(autonomic nervous system) 220
自主特化(autonomous specification) 124
自主型发育(autonomous development) 144
足迹法(footprinting) 392
组成型异染色质(constitutive heterochromatin) 372
组织变形(metaplasia) 300
组织分解(histolysis) 309
组织生成(histogenesis) 310
组织相容性抗原(histocompatibility antigen) 88
组织者(organizer) 6,157,179,189
最短的插入规则(shortest intercalation) 276
左侧决定子(left determinant) 145
左－右轴(left－right axis) 164